



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA  
E TERAPÊUTICA

Amanda de Souza Magalhães

**PERFIL DE EXOSSOMOS PERIFÉRICOS NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DO  
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Porto Alegre

2016

Amanda de Souza Magalhães

**PERFIL DE EXOSSOMOS PERIFÉRICOS NAS FASES AGUDA E CRÔNICA DO  
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre

2016

## CIP - Catalogação na Publicação

Magalhães, Amanda de Souza

Perfil de exossomos periféricos nas fases aguda e crônica do acidente vascular encefálico / Amanda de Souza Magalhães. -- 2016.

76 f.

Orientadora: Ionara Rodrigues Siqueira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Acidente vascular isquêmico. 2. Estresse oxidativo. 3. Exossomo. 4. Comprometimento cognitivo. I. Siqueira, Ionara Rodrigues, orient.  
II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria muito de agradecer pela minha família, por toda força e suporte que recebo deles todos os dias.

Gostaria de agradecer ao meu pai Jairo que sempre se preocupou em proporcionar a melhor qualidade de ensino para mim e sempre respeitou o meu espaço para estudar. Homem estudioso que preza a excelência em todo o seu trabalho.

À minha amada mãe Tania, mulher lutadora e corajosa, que voltou a estudar depois dos seus 60 anos. Ela me motiva todos os dias com a sua garra de vencer na vida. Obrigada por aguentar as minhas crises de ansiedade e desespero.

Ao meu namorado Marcelo, que mesmo morando tão longe, sempre me acudiu nos momentos mais desesperadores, me auxiliando em muitas madrugadas a conseguir aqueles artigos que eu não tinha acesso...Me confortou e me estendeu a mão em todos os momentos em que eu precisei. Agradeço a tua gigante generosidade e amor que tens por mim.

Sou inteiramente grata pela força braçal e psicológica que todo o grupo do laboratório da Neuropsicofarmacologia da UFRGS me proporcionou. Este laboratório é uma verdadeira equipe, não faltam alunos dedicados a te oferecerem ajuda.

Gostaria muito de agradecer à minha inteligente, dedicada e destemida professora orientadora, Ionara Rodrigues Siqueira. Uma mulher inspiradora, de garra e de bom coração, que não se convencia em ensinar somente alunos de universidade, mas que foi mais longe, criando projeto social de educação em escola da periferia, com crianças carentes, proporcionando novos caminhos e perspectivas para elas. Obrigada por me influenciar positivamente nessa minha caminhada.

E também, gostaria de agradecer a UFRGS e ao PPG Farmacologia e Terapêutica por me acolherem como aluna da sua primeira turma de pós graduação. Parabéns pela dedicação com os alunos e com o empenho em proporcionar ensino com excelente qualidade para o nosso país.

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.”

José Saramago (A Jangada e a Pedra)

## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença comum e de grande impacto para a saúde da população, uma vez que é considerado a principal causa de incapacidades neurológicas, principalmente motora e cognitiva. Considerando que os exossomos e o seu conteúdo podem ser marcadores prognóstico de demência em pacientes com Doença de Alzheimer, avaliamos o perfil exossomal circulante em pacientes pós AVE isquêmico com e sem comprometimento cognitivo. Ainda, é de conhecimento que os pacientes tratados com trombolíticos apresentam redução na dependência funcional a longo prazo, assim é de interesse avaliar os exossomos periféricos destes pacientes. Este trabalho visou investigar o perfil de exossomos circulantes em pacientes após diagnóstico de AVE isquêmico (AVEI) nas fases aguda e crônica. Foram determinados o conteúdo de proteína total e a atividade da acetilcolinesterase (AChE), marcadores de exossomos, além de correlacionar escores de comprometimento neurológico com os parâmetros bioquímicos. Ainda, considerando que o estresse oxidativo tem um papel central na fisiopatologia da isquemia cerebral, determinamos o conteúdo de espécies reativas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos circulantes. Os fatores comprometimento cognitivo e o uso do trombolítico na fase aguda da doença não mostraram ter influência sobre os parâmetros estudados. Os resultados sugerem que uma diminuição de exossomos circulantes, já que houve uma redução na quantificação de proteínas totais na fase crônica, pode sugerir um prejuízo no sistema de remoção de materiais tóxicos levando ao acúmulo de materiais indesejados. Além disso, o estado oxidativo exossomal, representado pelos níveis de espécies reativas e a atividade da SOD, foi alterado na fase crônica quando comparado com a fase aguda. Estes resultados sugerem que há uma alteração do perfil dos exossomos ao longo do tempo nos pacientes com AVE isquêmico. Nossos dados indicam que os níveis de espécies reativas na fase aguda podem prever alterações no perfil dos exossomos na fase crônica de pacientes com comprometimento cognitivo, especificamente nas atividades das enzimas SOD e AChE e na concentração de proteínas totais. Estas associações não foram observadas em pacientes sem comprometimento cognitivo. Correlacionamos os parâmetros bioquímicos com as escalas de déficit neurológico, os escores do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) foram inversamente proporcionais aos níveis de AChE naqueles pacientes que não receberam o tratamento trombolítico na fase aguda. Assim, nossos dados demonstram que o prejuízo cognitivo (menores escores de MEEM) está associado a maiores níveis de atividade da AChE em exossomos circulantes. O papel dos

exossomos na fisiopatologia da isquemia cerebral, assim como na predição de diagnóstico de comprometimento cognitivo precisa ser melhor investigado.

Palavras-chave: Acidente vascular isquêmico; estresse oxidativo; exossomo; comprometimento cognitivo.

## ABSTRACT

Stroke is a common disease and has a major impact on the public health, since it is considered the main cause of neurological disabilities, mainly motor and cognitive impairment. Considering that exosomes' content may be prognostic markers of dementia in patients with Alzheimer's disease we evaluated the circulating exosomal profile in patients with ischemic stroke with and without cognitive impairment. Furthermore, it is known that thrombolytic therapy reduces long-term disability, so it is interesting to evaluate the peripheral exosomes of these patients. This work aimed to investigate the profile of circulating exosomes in patients after diagnosis of ischemic stroke in the acute and chronic phases. Total protein content and acetylcholinesterase activity (AChE), markers of exosomes were determined, also it was correlated the scores of cognitive function tests with biochemical parameters. Considering that oxidative stress plays a central role in the pathophysiology of cerebral ischemia, we determined the content of reactive species and the activity of the superoxide dismutase enzyme (SOD) in circulating exosomes. The factors cognitive impairment and the use of thrombolytic in the acute phase of the disease did not show influence on the studied parameters. The results suggest that a decrease in circulating exosomes, since there was a reduction in the quantification of total proteins in the chronic phase, may suggest a damage in the system of removal of toxic materials leading to the accumulation of unwanted materials. The exosomal oxidative state, represented by the reactive species levels and the SOD activity, was altered in the chronic phase when compared to the acute phase. These results suggest that the profile of the exosomes is altered over time in patients with ischemic stroke. Our data indicate that reactive species levels in the acute phase may predict changes in the exosome profile in the chronic phase of patients with cognitive impairment, specifically in the activities of SOD and AChE enzymes and in the concentration of total proteins. These associations were not observed in patients without cognitive impairment. We correlated the biochemical parameters with the the scores of the assessment of cognitive function tests, the Mini-Mental State Examination (MMSE) scores were inversely proportional to the AChE levels in those patients who did not receive the thrombolytic treatment in the acute phase. Thus, our data demonstrate that cognitive impairment (lower MMSE scores) is associated with higher levels of AChE activity in circulating exosomes. The role of exosomes in the pathophysiology of cerebral ischemia, as well as in the prediction of diagnosis of cognitive impairment, needs to be better investigated.



Keywords: stroke, oxidative stress; exosome; cognitive impairment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do AVE isquêmico e hemorrágico.....	16
Figura 2 – Mecanismos envolvidos na morte neuronal após evento isquêmico.....	20
Figura 3 – Formação de espécies reativas centradas no oxigênio.....	21
Figura 4 – Esquema representativo da reação de Haber-Weiss.....	22
Figura 5 – Esquema representativo da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).....	23
Figura 6 – Representação esquemática de uma célula secretora de exossomos e outras vesículas.....	26
Figura 7 – Mecanismo de ação do rt-PA.....	28
Figura 8 – Concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica.....	42
Figura 9 – Atividade da AChE em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica.....	43
Figura 10 – Conteúdo de espécies reativas, avaliado pelo DCF formado em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica.....	44
Figura 11 – Atividade da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica.....	45
Figura 12 – Correlação entre a atividade da SOD e a concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase aguda.....	46
Figura 13 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) e a concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica.....	47
Figura 14 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) e a atividade da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica.....	48
Figura 15 – Correlação entre a atividade da AChE e o conteúdo das proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica.....	49
Figura 16 – Correlação entre as atividades da AChE e da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica.....	50
Figura 17 – Correlação entre níveis de espécies reativas (DCF formado) na fase aguda e o conteúdo das proteínas totais (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo.....	51

Figura 18 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) na fase aguda e a atividade da AChE (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo.....	52
Figura 19 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) fase aguda e a atividade da SOD (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo.....	53
Figura 20 – Correlação entre escore MEEM com a atividade da AChE em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase aguda.....	54

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Cortes do critério Brasil.....	33
Tabela 2 – Renda familiar por classes econômicas.....	33
Tabela 3 – Caracterização dos pacientes quanto aos aspectos pessoais e clínicos.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$	Peptídeo $\beta$ -amiloide
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATP	Trifosfato de adenosina
AVE	Acidente vascular encefálico
AVEI	Acidente vascular encefálico isquêmico
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CAT	Catalase
CDR	<i>Clinical Dementia Rating</i>
Ch	Colina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CuZn-SOD	Superóxido dismutase - cobre e zinco
DCF	Diclorofluoresceína oxidada
DCFH	2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	2'7'-diclorofluoresceína diacetato
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
g	Gramas
GPx	Glutathiona peroxidase
H <sup>+</sup>	Íon hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
MEEM	Mini-Exame do Estado Mental
mL	Mililitros
MnSOD	Superóxido dismutase – manganês
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Adenosina Trifosfatase ativada por Sódio, Potássio e Magnésio
NIHSS	<i>National Institute of Health Stroke Scale</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO $\cdot$	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> $\cdot^-$	Radical ânion superóxido

°C	Graus Celsius
OH·	Radical hidroxil
pH	Potencial hidrogeniônico
rt-PA	Ativador de plasminogênio tissular
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase-cobre e zinco
μL	Micro litro

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	16
1.2 AVALIAÇÃO DE DÉFICITS NEUROLÓGICOS.....	17
1.3 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO ....	19
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	21
1.5 EXOSSOMOS .....	23
1.6 TERAPÊUTICA TROMBOLÍTICA NO AVEL.....	27
<b>2 HIPÓTESES.....</b>	<b>29</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>31</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	31
4.2 CAMPO DE ESTUDO .....	31
4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	31
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	31
4.5 COLETAS DOS DADOS.....	32
4.5.1 Avaliação do desempenho cognitivo.....	32
4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	33
4.7 COLETA DE SANGUE .....	34
4.7.1 Isolamento de exossomos circulantes .....	34
4.7.2 Níveis de espécies reativas em exossomos .....	35
4.7.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos.....	35
4.7.4 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em exossomos.....	35
4.7.5. Quantificação de proteínas totais .....	36
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
4.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	36
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A – NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH STROKE SCALE – NIHSS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO B – ESCALA CLINICAL DEMENTIA RATING – CDR.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO C – MINI EXAME DO ESTADO MENTAL – MEEM .....</b>	<b>74</b>

**ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....75**  
**ANEXO E – PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA .....77**



## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

No Brasil, a doença cerebrovascular é uma das principais causas de óbito e dependência, observando-se uma taxa de mortalidade de 51,8 a cada 100.000 habitantes. O grupo acima de 80 anos representou quase 35% dos 99.174 óbitos (BRASIL, 2010) .

Os distúrbios cerebrovasculares representam o grupo mais frequente de doenças do sistema nervoso central (SNC) (GROSS et al., 1988 & SHINKAWA et al., 1995).

Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a mortalidade pelo Acidente Vascular Encefálico (AVE) varia de 13,8% a 20,6% na população acima de 60 anos, permanecendo como principal causa de morte e incapacidade nessa população (BRASIL, 2010). O AVE pode ser definido como uma perturbação focal ou global da função cerebral, de rápido desenvolvimento, e que resulta em sinais clínicos com mais de 24 horas de duração e com possível origem vascular. Os AVEs são divididos em duas principais categorias: isquêmica e hemorrágica (Figura 1), envolvendo prejuízos das vias sensoriais e motoras (OMS, 1988).

Aproximadamente 80% dos AVEs são decorrente da oclusão vascular, isto é, de etiologia isquêmica, sendo que a artéria mais comumente ocluída é a artéria cerebral média ou suas ramificações profundas (STOKES, 2004). Considerando a incidência, a busca de tratamento a fim de reduzir a mortalidade e a incapacidade é focada especialmente no AVE isquêmico (OMS, 1988).

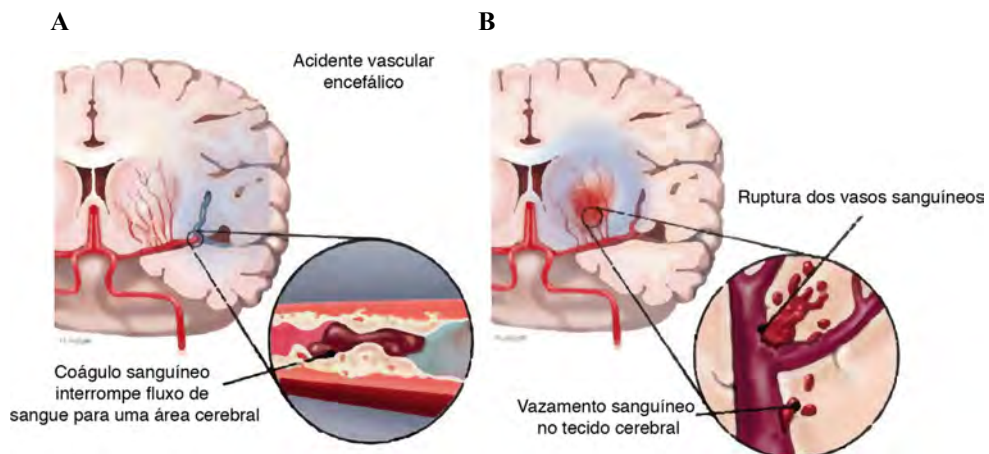


Figura 1: Representação do AVE isquêmico (A) e hemorrágico (B). Adaptado de Heart and Stroke Foundation of Canada (2016).

## 1.2 AVALIAÇÃO DE DÉFICITS NEUROLÓGICOS

Além do acometimento das vias sensório-motoras, que levam ao prejuízo motor e à perda da função, aproximadamente 1/3 dos pacientes desenvolve demência após o AVE, o que leva ao aumento da dependência e triplica as taxas de mortalidade (DURON; HANON, 2008). Alguns estudos mostram que o prejuízo cognitivo retarda a recuperação da dependência funcional, predizendo pior desempenho em atividades da vida diária (PATEL; COSHALL; RUDD, 2002; POHJASVAARA et al., 1998). Além disso, o surgimento de demência aumenta em 2,5 vezes o risco de morte em pacientes com AVE (TATEMICHI et al., 1993), além de aumentar o risco de novas recorrências (MORONEY et al., 1997).

O termo Demência Vascular refere-se a qualquer demência causada por doença cerebrovascular e resulta de diversas áreas isquêmicas associadas com importante hipoperfusão cerebral e lesões hemorrágicas, que são manifestadas através de inúmeras síndromes clínicas (ANDRE, 1998). Isquemias cerebrais, mesmo únicas, dependendo de sua localização podem resultar em demência. Em estudos clínicos, a proporção de demência vascular causada por disfunção de pequenos vasos pode chegar de 36 a 67% dos casos (CHUI, 2001). Ainda, os infartos lacunares são encontrados em 10 a 31% das lesões sintomáticas (SACCO et al., 1991). Uma proporção significativa é clinicamente silenciosa ou então se manifesta de uma maneira sutil na marcha ou como um prejuízo cognitivo leve, normalmente não reconhecido como AVE. Estudos de base populacional, de prevalência de lacunas silenciosas, indicam que sua incidência passou de 11% para 24% (KASE et al., 1998; SHINKAWA ET AL., 1995).

Escalas padronizadas auxiliam a mensuram o dano neurológico, perda ou anormalidade de uma função psicológica, fisiológica ou anatômica; abordam a incapacidade, ou seja, a restrição ou carência resultante na habilidade de executar uma tarefa dentro de padrões considerados normais; ou ainda avaliar a invalidez, que resulta em prejuízos que afetam o indivíduo em seu contexto social após seu acometimento (ORGOGOZO, 1994). Existem diversas escalas que avaliam comprometimento neurológico em pacientes após o AVE e as mais utilizadas são: Escala de Rankin, Índice de Barthel e a escala *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) (CINCURA et al., 2009).

A escala NIHSS é um instrumento de avaliação quantitativa com confiabilidade e validade estabelecida para utilização em ambiente clínico e em pesquisa. É composta por 11 itens, dentre eles podemos citar a avaliação do nível de consciência, respostas a comandos,

movimentação ocular, função motora de braços e pernas, linguagem, entre outros. Cada item recebe uma pontuação que pode variar de 0-2, 0-3 ou 0-4. A pontuação total pode atingir valores de 0-42 pontos, indicando que quanto maior o valor do NIHSS, maior a gravidade neurológica no AVE. A aplicação da escala pode ser realizada tanto pela equipe médica como por profissionais de saúde com treinamento e certificação comprovados (SCHLEGEL et al., 2003).

Para avaliação clínica de demência foi desenvolvido em 1979 a escala *Clinical Dementia Rating* (CDR) pela Universidade de Washington nos Estados Unidos da América, com o objetivo de classificar demência nos pacientes com diagnóstico de doença de Alzheimer (HUGHES et al., 1982). Atualmente, a escala contém questionamentos tanto para o próprio paciente, como para o seu familiar/cuidador, sendo importante que estes estejam bem informados em relação ao estado de saúde do paciente. O CDR avalia seis domínios do desempenho cognitivo, como por exemplo: memória, orientação, julgamento, assuntos da comunidade, lar e hobbies e cuidados pessoais. Através de um algoritmo, as categorias do CDR são listadas como: zero (sem demência), 0,5 (demência questionável), 1 (demência leve), 2 (demência moderada) e 3 (demência grave). Apesar da escala de CDR apresentar forte confiabilidade e validade, é considerada uma escala que, na prática clínica, limita o seu uso pelo fato da quantidade considerável de informações que devem ser coletadas e a necessidade da disponibilidade de pelo menos um informante durante a sua aplicação (NYUNT et al., 2013). Portanto, instrumentos breves e de avaliação simples se tornam mais apropriados neste contexto, como é o caso do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) (FOLSTEIN et al., 1975).

A escala MEEM permite a investigação de parâmetros cognitivos, contendo questões agrupadas em sete categorias: orientação temporal (5 pontos), orientação espacial (5 pontos), registro de três palavras (3 pontos), atenção e cálculo (5 pontos), recordação das três palavras (3 pontos), linguagem (8 pontos) e capacidade construtiva visual (1 ponto). O escore do MEEM pode variar de um mínimo de 0 pontos, o qual indica o maior grau de comprometimento cognitivo dos indivíduos, até um total máximo de 30 pontos, o qual, por sua vez, corresponde a melhor capacidade cognitiva (DICK; GUILOFF; STEWART, 1984). Essa escala também leva em conta diferentes pontos de corte ajustados para a escolaridade (em anos) de cada indivíduo, pois um único corte pode perder casos entre pessoas com mais anos de educação e gerar falsos positivos entre aqueles com menor grau de instrução (CHAVES, 2008). O ponto de corte mais frequentemente utilizado para indicar

comprometimento cognitivo é o número 24 (LINDAL; STEFANSSON, 1993). Para realizar análise de concordância entre as escalas que avaliam comprometimento cognitivo CDR e MEEM, na população brasileira, alguns autores sugeriram realizar o ponto de corte para deficit cognitivo quando a escolaridade  $> 4$  anos, MEEM  $\leq 24$  e escolaridade  $\leq 4$  anos, MEEM  $\leq 17$  (MAIA et al., 2006).

Com treinamentos e utilização de rotina, as escalas CDR e MEEM podem ser utilizada como instrumento de diagnóstico e presença de comprometimento cognitivo e/ou demência (KOCHHANN et al., 2010; CHAVES 2007).

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

O Acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) pode se manifestar na forma trombótica, embólica, por hipoperfusão sistêmica ou trombose venosa. A isquemia é caracterizada por uma redução severa ou pela total interrupção do aporte sanguíneo. A dependência do metabolismo aeróbico torna o tecido cerebral vulnerável aos efeitos da isquemia (SIESJO, 1978). Além disso, o encéfalo é particularmente vulnerável ao dano isquêmico, já que possui uma alta taxa metabólica, além de restritas reservas energéticas. Insultos ao tecido cerebral causam disfunção neuronal e podem levar à morte celular (MELDRUM, 1990).

Muitos eventos fisiopatológicos são desencadeados pela isquemia cerebral. A análise geral dos mecanismos de lesão na morte neuronal isquêmica é bastante interessante, pois vários dos eventos da injúria são interdependentes, possuindo um grande número de interações (GLOBUS et al., 1991) (Figura 2). A redução dos níveis de oxigênio, resultante do bloqueio do fluxo sanguíneo, interrompe a fosforilação oxidativa, passando a glicólise anaeróbica a ser a fonte de trifosfato de adenosina (ATP), o que não é suficiente para as necessidades das células cerebrais. Ocorre então a acidose, graças ao acúmulo de lactato e de  $H^+$  e ao aumento de  $CO_2$ ; o pH do tecido pode chegar próximo de 6,0 (FUNAHASHI; FLOYD; CARNEY, 1994). Atividades dependentes de energia reduzem seu funcionamento pela depleção de ATP, que ocorre em cerca de 4 minutos, como, por exemplo, as bombas iônicas. A redução funcional da  $Na^+-K^+-ATPase$  resulta na perda dos gradientes iônicos transmembrana, levando à despolarização da membrana e, assim, à abertura de canais iônicos voltagem-dependentes. A entrada de  $Ca^{2+}$  estimula a liberação de neurotransmissores das

vesículas, como o glutamato (MEHTA, MANHAS, RAHUBIR, 2007; CHOI, DUGAN, 1999).

As concentrações dos aminoácidos excitatórios, glutamato e aspartato estão elevadas no cérebro de ratos submetidos à isquemia transitória (GLOBUS et al., 1991) devido ao aumento da liberação sináptica destes aminoácidos e também pela diminuição de sua recaptação sináptica. Este fenômeno está associado, então, ao influxo e o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular, devido à despolarização pela inativação das bombas iônicas. A ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA também leva ao influxo de cálcio (KAHLES, BRANDES, 2012; ANDINE; JACOBSON; HAGBERG, 1988). Diversos estudos demonstraram que a via final de dano neuronal isquêmico é a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (NIATSETSKAYA et al., 2012; YAMATO, EGASHIRA, UTSUMI, 2003). O excesso na produção de espécies reativas, por sua vez, resulta em apoptose, inflamação, danos ao DNA, peroxidação lipídica e desnaturação de proteínas, os quais contribuem para ampliar os danos causados pelo acidente vascular cerebral (SHIRLEY; ORD; WORK, 2014).

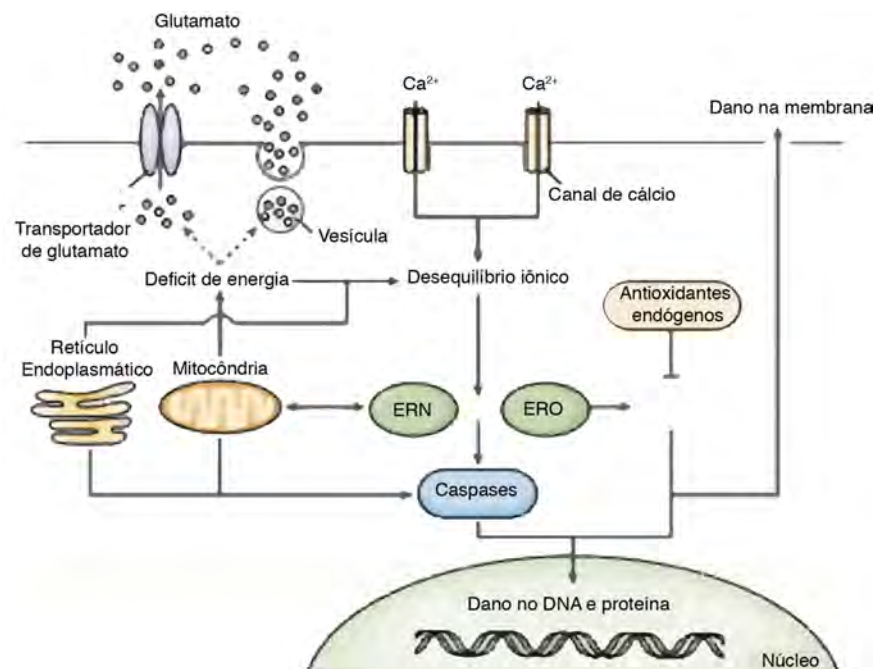


Figura 2: Mecanismos envolvidos na morte neuronal após evento isquêmico. Adaptados de Globus e colaboradores (1991).

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O termo estresse oxidativo refere-se a um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do organismo contra as espécies reativas, levando a um progressivo dano oxidativo. Quando os níveis de oxigênio são reduzidos, tanto na fosforilação oxidativa quanto em outras reações, há formação de radicais livres, que constituem moléculas com existência independente e que contém um ou mais elétrons não pareados na última camada eletrônica (Figura 3). Esta configuração faz dos radicais livres espécies quimicamente muito reativas e de meias-vidas curtas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

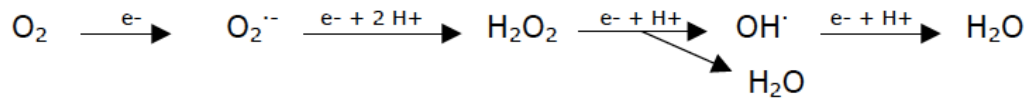


Figura 3: Formação de espécies reativas centradas no oxigênio. Adaptado de Renz (2003).

Como descrito acima, o estresse oxidativo desempenha um papel central no processo fisiopatológico durante o AVEI e a morte neuronal vem sendo associada com o aumento na produção de espécies reativas (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005). Durante a isquemia cerebral, vários eventos predisõem o encéfalo à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o rápido decréscimo nos níveis de ATP, perda da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , excitotoxicidade, metabolismo e liberação do ácido araquidônico, disfunção mitocondrial, acidose e edema (CAO et al., 1988).

Ainda a reperusão, após isquemia cerebral, eleva a formação de espécies pró-oxidantes no tecido encefálico, as quais podem contribuir para a injúria neuronal por atacar diretamente macromoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA ou indiretamente atingindo os caminhos de sinalização celular e regulação da expressão gênica (MORO et al., 2005).

O metabolismo das purinas é uma importante fonte de radicais livres no evento isquêmico. O influxo de cálcio ativa proteases celulares, as quais convertem a enzima xantina desidrogenase, que em condições normais transforma hipoxantina em xantina e ácido úrico, em xantina oxidase, que na reperusão usa o oxigênio molecular como o acceptor de elétrons, produzindo radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) (CAO et al., 1988).

O principal radical livre gerado durante a isquemia cerebral é o radical  $O_2^-$ , o qual gera o radical  $OH^\cdot$ , que possui um forte potencial de destruição dos tecidos, através da reação de Haber-Weiss (Figura 4). O  $O_2^-$  é gerado em mitocôndrias, leucócitos ativados, na cascata do ácido araquidônico e pode ser resultante de reações catalisadas por enzimas como a monoamina oxidase e xantina oxidase. O aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ativa a enzima NOS, gerando o radical óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ); o  $NO^\cdot$  reage com o  $O_2^-$  e forma o ânion peroxinitrito, que pode gerar radicais hidroxil (BECKMAN et al., 1990).

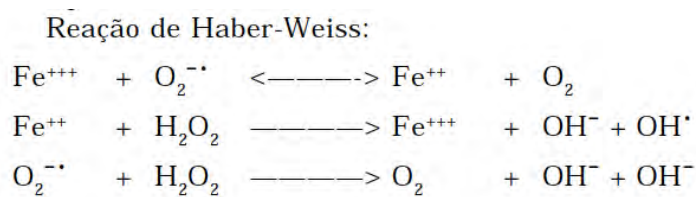


Figura 4. Esquema representativo da reação de Haber-Weiss. (Ferreira, Matsubara, 1997).

Outro mecanismo que parece contribuir para a injúria isquêmica, onde os radicais livres estão envolvidos, é a resposta inflamatória: os neutrófilos e a micróglia respondem à injúria isquêmica produzindo radicais livres. A infiltração leucocitária no endotélio microvascular cerebral está relacionada ao declínio secundário no fluxo sanguíneo cerebral após o episódio isquêmico (MORI et al., 1992) e na extensão da injúria isquêmica (ALLEN, BAYRAKTUTAN, 2009; ZHANG et al., 1994).

A neutralização de oxidantes por diferentes mecanismos de defesa é responsável pela manutenção dos componentes vitais (ZIMMERMANN et al., 2004). A defesa enzimática envolve a ação cooperativa de três principais enzimas intracelulares antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Figura 5). Já os antioxidantes não-enzimáticos são: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e glutatona reduzida (DASURI et al., 2013; UTTARA et al., 2009). A enzima SOD possui um importante papel antioxidante através da sua ação catalisadora da reação do radical ânion superóxido  $O_2^-$  em peróxido de hidrogênio e água. Já foram descritas na literatura três isoformas distintas da enzima, SOD-cobre e zinco (SOD1), SOD manganês (SOD2) e SOD extracelular (SOD3) (DASURI et al., 2013). Além do papel antioxidante desenvolvido pela SOD, estudos relatam aumento da expressão dessa enzima em animais *knock-out* provando que suas isoformas estão ativamente envolvidas na neuroproteção após isquemia cerebral (CHEN et al., 2011). Ainda, estudos observaram que as atividades da SOD no plasma (SAPOJNIKOVA et al., 2012), soro (SPRANGER et al., 1997) e eritrócitos (CORRÊA et al.,

2008) de pacientes com AVE isquêmico foram significativamente menores comparados aos controles. A maioria dos estudos indica que a concentração e atividade de SOD têm uma correlação significativa com déficit neurológico e tamanho do infarto.

Além disso, recentemente, foi verificada uma via interessante de transporte de enzimas antioxidantes entre células neuronais, em modelo de isquemia cerebral, através de vesículas extracelulares, dentre elas podendo citar os exossomos (FRÖHLICH et al., 2014). Com tudo, a literatura traz diversos trabalhos que quantificam as espécies reativas e atividade enzimática antioxidante em tecidos cerebrais de animais (BERTOLDI, 2016) e em sangue de pacientes (CORRÊA et al., 2008), no entanto, o papel dos exossomos circulantes como transportadores destas moléculas ou átomos no AVEI ainda não foi investigado.

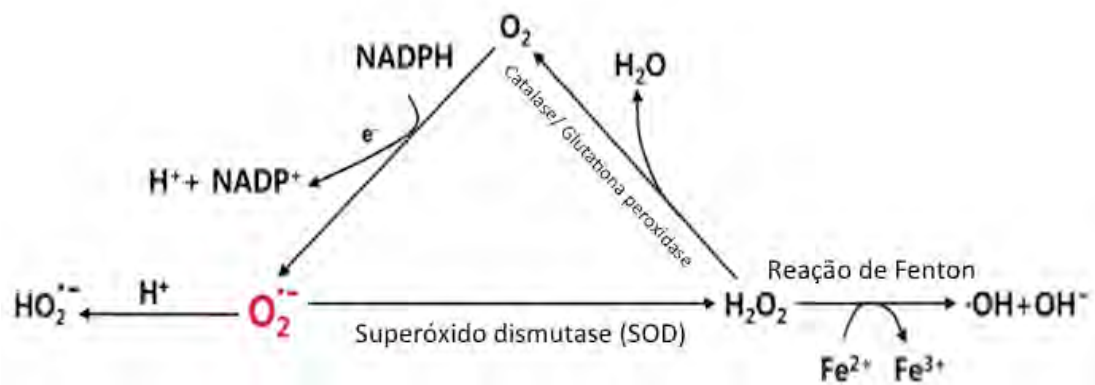


Figura 5. Esquema representativo da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (adaptado de Kim et al., 2015).

## 1.5 EXOSSOMOS

Em 1975, foi descrito que micropartículas são liberadas após ativação de células hematopoiéticas tais como monócitos, linfócitos, eritroblastos e granulócitos. Além disso, plaquetas liberam micropartículas quando estimuladas com agonistas como a trombina e o colágeno. Essas micropartículas derivadas de plaquetas possuem diversos receptores endoteliais de adesão celular, como por exemplo, as glicoproteínas IIb/IIIa (CD41), Ib e IaIIa e selectina-P (CD62P). Estudos mostram que os níveis dessas micropartículas estão aumentados em diversos estados patológicos tais como púrpura trombocitopênica (JIMENEZ et al., 1975), sepse (NIEUWLAND et al., 2000) e trombocitopenia induzida por heparina (HUGHES et al., 2000).



O papel dessas micropartículas derivadas de plaquetas em isquemia cerebrovascular e doenças coronarianas tem sido alvo de estudos. Por exemplo, foi demonstrado que a hiperativação e agregação plaquetária estão envolvidas na patogênese do AVEI e, além disso, estão associadas com fatores de risco do AVE como a hipertensão e a hipercolesterolemia (JUNG et al., 2012).

Estudos prévios demonstraram que o aumento dos níveis de micropartículas derivadas de plaquetas em desordens isquêmicas cerebrovasculares (acidente vascular encefálico e transitório, demência vascular), sugerindo que a ativação plaquetária desempenha papel importante no AVE isquêmico (LUKASIK et al., 2013; KURIYAMA et al., 2010; LEE et al., 1993). Recentemente, essas micropartículas têm sido chamadas de vesículas extracelulares, entre elas estão os exossomos.

Os exossomos fazem parte do grupo das vesículas extracelulares, caracterizadas de acordo com seu tamanho, origem, composição e densidade. Os exossomos contêm uma bicamada lipídica e medem aproximadamente 30-120 nm de diâmetro e possuem proteínas de membrana específicas tais como Tsg101, Alix, Gag e tetraspaninas (CD63, CD81 e CD9), cujo conteúdo é tomado para a quantificação de exossomos (VACCARI et al., 2015; YANG; GOULD, 2013; BELLINGHAM et al., 2012). Ainda, autores sugerem a enzima acetilcolinesterase (AChE) como uma enzima presente em exossomos (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). No entanto, visto que uma diminuição do sistema colinérgico central parece possuir um papel central no processo neurodegenerativo e no declínio cognitivo (HAIDER et al., 2014; WEINREB et al., 2015) o potencial uso da AChE como marcador de exossomos necessita de mais estudos. Estas vesículas são secretadas pela maioria das células e podem ser encontradas em fluidos biológicos, tais como sangue (LOOZE et al., 2009), urina (GONZALES et al., 2009), saliva (MICHAEL et al., 2014), leite materno (ADMYRE et al., 2007) e sêmen (VOJTECH et al., 2014) e também no SNC (STREET et al., 2012).

Os exossomos exercem diversas funções dependentes da sua origem celular; estudos confirmaram sua participação na regulação da resposta imune, proliferação celular, diferenciação e senescência (ZHANG et al., 2014; GUTZEIT et al., 2014; VAN BALKOM et al., 2013). Além disso, embora o papel dos exossomos ainda não esteja totalmente elucidado, outra função associada a estas vesículas foi a de carreadores de proteínas indesejadas e toxinas para degradação, uma função de “limpeza” celular (GUPTA & PULLIAM, 2012; TICKNER et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que estas vesículas são

especializadas em comunicação intercelular de longa distância facilitando a transferência de proteínas, mRNAs e microRNAs funcionais (Brites & Fernandes., 2015; Haney et al., 2013).

No SNC, os exossomos possuem funções sob condições fisiológicas e patológicas. Essas vesículas agem como mediadores de diversos processos importantes para um funcionamento normal do cérebro e aporte neuronal, tais como a neuroinflamação. Além disso, promovem sinalização intercelular sem requerer contato direto entre os neurônios. Os exossomos também estão envolvidos em plasticidade neuronal e na promoção de neuroproteção e regeneração após lesão ou doença (WANG et al., 2011; FRUHBEIS et al., 2013). Ainda há evidências que os exossomos têm a propriedade de distribuir proteínas patogênicas, tais como  $\alpha$ -sinucleína, proteína precursora do amilóide e Tau fosforilada, que estão envolvidos na doença de Parkinson e doença de Alzheimer (JOSHI et al., 2014; SAMAN S et al., 2012; RAJENDRAN et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado um possível papel dos exossomos durante o estresse oxidativo. Em relação a condições patológicas, como durante o choque séptico, alguns autores observaram que os exossomos circulantes são capazes de produzir espécies reativas intrinsecamente (AZEVEDO et al., 2007; JANISZEWSKI et al., 2004). Além disso, recentemente, Fröhlich e colegas (2014) demonstraram um papel dos exossomos na transferência de moléculas com atividade antioxidante, especificamente a SOD e a catalase, entre oligodendrócitos e neurônios. Gomes e colaboradores (2007) demonstraram a liberação via exossomos de SOD1 mutada em um modelo de esclerose lateral amiotrófica. Esses dados sugerem que essas microvesículas podem constituir uma forma de comunicação intercelular e transferência de SOD mutante. Considerando que a SOD está envolvida em doenças neurodegenerativas e pode ser detectada nos exossomos, é de interesse quantificar a atividade desta enzima em exossomos no AVE.

É interessante comentar que as vesículas extracelulares, como os exossomos, podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), indicando que exossomos periféricos podem interferir na função cerebral e exossomos de origem central podem ser detectados no plasma. A passagem de exossomos do sangue para a BHE torna essas vesículas alvo de grande interesse quando se avalia a possibilidade de utilizá-los em diagnósticos clínicos e na descoberta de biomarcadores para distúrbios que afetam o SNC (GRAPP et al., 2013).

Portanto, sugerimos os exossomos em métodos preditores de eficácia de tratamento e de diagnóstico. A maioria dos estudos têm se dedicado para as áreas de oncologia e imunologia em contraste com a área de acidente vascular encefálico (KANNINEN et al.,

2015). Estudo recente mostrou que o tratamento sistêmico com exossomos derivados de células estromais mesenquimais multipotentes promoveu remodelamento neurovascular e recuperação funcional após isquemia em ratos. Embora exista o relato sobre o uso potencial de exossomos na terapia neuroprotetora no AVE (XIN et al., 2013), não há estudos, do nosso conhecimento, que relataram o uso de exossomos como biomarcadores para AVE. Uma vez que os métodos de isolamento, extração e detecção de exossomos têm sido bastante estudados, espera-se que a utilização de exossomos como biomarcadores sanguíneos para doença isquêmica seja também desenvolvido com o intuito de utilização como ferramenta prognóstica e/ou diagnóstica.

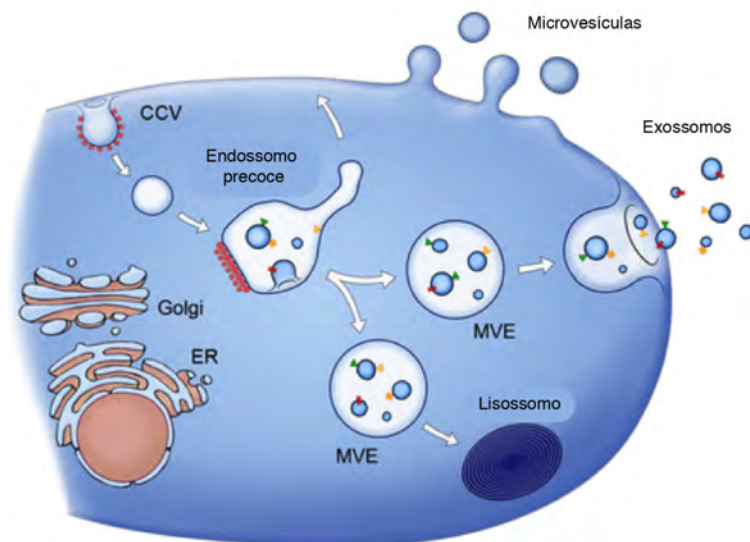


Figura 6. Representação esquemática de uma célula secretora de exossomos e outras vesículas. Tráfego intracelular ocorre tanto entre a membrana celular e os compartimentos subcelulares. Adaptado de Raposo e Stoorvogel (2013).

Neste contexto, sugerimos que os exossomos e o seu conteúdo podem ser marcadores prognóstico de demência em pacientes com AVE. Cabe descrever que uma interessante relação foi estabelecida com a Doença de Alzheimer, onde são encontrados altos níveis centrais de peptídeo amilóide (e a agregação, as placas amilóides) e da proteína tau fosforilada. Os níveis destes marcadores em exossomos são maiores 1 a 10 anos antes do diagnóstico de Alzheimer, demonstrando seu potencial prognóstico de demência (FIANDACA et al., 2015).

Uma relação entre a fisiopatologia da Doença de Alzheimer com a do AVE tem sido descrita. A isquemia cerebral em ratos induziu em longo prazo uma acumulação do peptídeo  $\beta$ -amilóide e a forma hiperfosforilada da proteína Tau e do precursor do peptídeo  $\beta$ -amilóide

em ratos (SILACHEV et al., 2014). Além disso, outro estudo observou que o peptídeo A $\beta$ 1-40 encontrado no plasma de pacientes após isquemia cerebral pode estar envolvido com aspectos vasculares da doença, assim como, o peptídeo A $\beta$ 1-42 pode estar envolvido com o processo neurodegenerativo (MOULIN et al., 2015).

Apesar da ampla literatura apontando o desequilíbrio entre a atividade das enzimas antioxidantes e radicais livres no AVE, o perfil oxidativo e o desenvolvimento de comprometimento cognitivo relacionado a esses parâmetros bioquímicos em exossomos ainda não foram explorados.

## 1.6 TERAPÊUTICA TROMBOLÍTICA NO AVEI

Atualmente, o ativador de plasminogênio tissular (rt-PA) representa a única intervenção farmacológica aprovada pela Agência Americana de Regulação de Medicamentos e Alimentos - *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento agudo AVEI (devendo ser administrado no prazo de 3 horas a partir do início dos sintomas. O rt-PA é uma enzima liberada pelas células endoteliais, especialmente as das pré-vênulas e das vênulas dos órgãos muito vascularizados (fígado, pulmão, útero, pâncreas, tireóide e próstata) (HAIRE; HERBST et al., 2000).

Alteplase é um medicamento da classe dos trombolíticos, ativador do plasminogênio tecidual humano recombinante, uma glicoproteína que ativa diretamente o plasminogênio em plasmina (Figura 7). Quando administrado por via intravenosa, a alteplase, uma vez ligada à fibrina, é ativada, induzindo a conversão de plasminogênio em plasmina, que por sua vez, promove a dissolução da fibrina do coágulo (MIELKE; WARDLAW; LIU, 2008).

O tratamento agudo do AVEI modificou radicalmente após a introdução de fármacos trombolíticos como o rt-PA. A aprovação dessa medicação foi motivada pelos resultados favoráveis do estudo realizado pelo *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS), que comprovou o benefício do uso do rt-PA na melhora ou resolução completa e precoce dos sintomas neurológicos, bem como na boa recuperação funcional dos pacientes três meses após a administração da droga (NINDS, 1995). Estes achados foram comprovados por metanálises que analisaram resultados de estudos randomizados, duplo-cegos e multicêntricos completos que consideraram a utilização do rt-PA na fase aguda do AVEI, como o estudo desenvolvido pela *European Cooperative Acute Stroke Studies* (ECASS), fases I e II (HACKE et al., 1995; HACKE et al., 1998), e o estudo *Alteplase Thrombolysis for*

Acute Neurointerventional Therapy in Ischemic Stroke (ATLANTIS) (CLARK et al., 1999). Diante disso, constatou-se que o uso da medicação Alteplase é eficaz no tratamento de pacientes com AVEI agudo (WARDLAW et al., 2001).

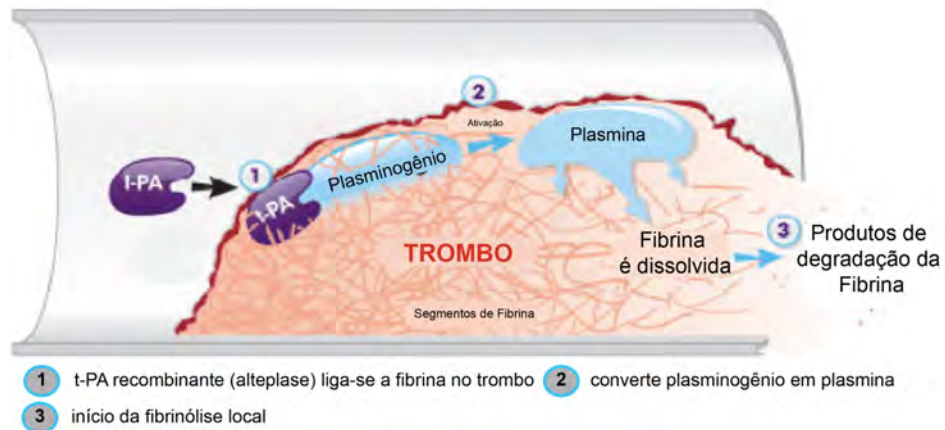


Figura 7: Mecanismo de ação do rt-PA. Adaptado do site *CathFlo® Activase®. Cathflo's proposed mechanism of action* (2016).

Considerando que as vesículas extracelulares derivadas de plaquetas podem estar relacionadas à agregação plaquetária e o tratamento trombolítico pela fibrinólise altera o processo hemostático, sugerimos que o tratamento com alteplase pode mudar o perfil de exossomos circulantes.

## **2 HIPÓTESES**

O perfil dos exossomos (e seu conteúdo) em pacientes com AVEI poderá estar relacionado ao comprometimento cognitivo, a demência vascular.

O tratamento com trombolítico pode alterar a quantidade e o conteúdo dos exossomos circulantes, e que esta alteração pode predizer quais subgrupos são sensíveis ao tratamento.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de exossomos circulantes em pacientes após diagnóstico de acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI) nas fases aguda e crônica do evento isquêmico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o conteúdo de espécies reativas e atividade da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica;
- Avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase em exossomos circulante de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica;
- Estudar o impacto do tratamento trombolítico sobre os parâmetros bioquímicos avaliados em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica;
- Correlacionar os dados bioquímicos com os escores de comprometimento cognitivo e de gravidade neurológica de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo, com delineamento transversal e caráter quantitativo que envolveu o uso de plasma, material biológico humano, previamente armazenado. Este material biológico foi obtido através de uma parceria com a Professora Dra. Márcia Lorena Fagundes Chaves, membro do serviço de neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), do PPG Ciências Médicas, através da sua coordenação no estudo intitulado “Relação entre fator natriurético tipo B, homocisteína e trombolíticos com o desenvolvimento de demência pós acidente vascular cerebral”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, sob o número de protocolo: 10-0336.

### 4.2 CAMPO DE ESTUDO

O material biológico humano armazenado foi proveniente de pacientes atendidos pela equipe da Neurologia Vascular do Serviço de Neurologia do HCPA.

### 4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra foi selecionada a partir daqueles pacientes que obtiveram diagnóstico de acidente vascular encefálico (AVE) agudo no período de agosto de 2010 a agosto de 2011. Dos 100 pacientes avaliados durante este período, foram selecionados aleatoriamente 22 pacientes para compor a amostra deste estudo. Esses pacientes foram divididos entre as fases aguda e crônica do evento isquêmico, totalizando duas avaliações por paciente:

- Fase Aguda: avaliados entre 30 a 90 dias do evento isquêmico;
- Fase Crônica: reavaliados após 24 meses da primeira avaliação (fase aguda).

### 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os pacientes que apresentaram prejuízo cognitivo, depressão ou afasia previamente ao AVE foram excluídos da amostra.



## 4.5 COLETAS DOS DADOS

### 4.5.1 Avaliação do desempenho cognitivo

Os pacientes foram avaliados conforme protocolo de pesquisa que inclui dados demográficos, condição médica geral, sintomas psiquiátricos e desempenho cognitivo. Estas avaliações foram realizadas em dois momentos; na primeira avaliação do paciente, 30-90 dias do evento isquêmico (fase aguda) e após 24 meses (fase crônica).

Nas primeiras 48 horas após o AVE, o paciente passou por uma avaliação de nível de consciência, campo visual, paralisia facial, força motora, ataxia, linguagem, disartria e atenção, segundo os critérios da *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS) (ANEXO A), sendo essa escala replicada na fase aguda e crônica (GOLDSTEIN LB, SAMSA, 1997).

Para rastreamento de demência foi aplicada a escala CDR (Clinical Dementia Rating) (CHAVES et al., 2007; MAIA et al., 2006; MORRIS, 1993). A escala CDR é um instrumento de diagnóstico e estadiamento de demência, foi desenvolvida pelo Memory and Aging Project at the Washington University School of Medicine (St Louis, Mo.) (HUGHES et al., 1982). O protocolo clínico inclui uma entrevista semi-estruturada com o paciente e com o acompanhante para obter informações necessárias com relação ao desempenho do indivíduo em relação a seis domínios: memória, orientação, julgamento e solução de problemas, assuntos da comunidade, lar e passatempos e cuidados pessoais. O CDR global (ANEXO B) é derivado da síntese do resultado em cada um dos seis domínios, zero indica ausência de demência, 0,5 demência questionável, 1 leve, 2 moderada e 3 severa (MORRIS, 1993).

Para avaliação do déficit cognitivo foi utilizado o teste Mini Estado do Exame Mental (MEEM) (CHAVES; IZQUIERDO, 1992; FOLSTEIN et al., 1975) (ANEXO C).

As variáveis, selecionadas com base na associação potencial ou estabelecida com déficit cognitivo, incluem características sócio demográficas (idade, sexo, escolaridade, estado civil, renda) cuja associação já é conhecida. A escolaridade é medida em total de anos aprovados (completos) e a classe econômica é medida através do Critério de Classificação Econômica Brasil de 2003 (Tabela 1 e 2) que estima o poder de compra das pessoas e famílias urbanas através da seguinte classificação: A1, A2, B1, B2, C, D e E.

Tabela 1 – Cortes do critério Brasil.

Classe	PONTOS	TOTAL BRASIL (%)
A1	30-34	1
A2	25-29	5
B1	21-24	9
B2	17-20	14
C	11-16	36
D	6-10	31
E	0-5	4

Fonte: ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2003. Dados com base no Levantamento Sócio Econômico – 2000 – IBOPE

Tabela 2 – Renda familiar por classes econômicas.

Classe	Pontos	Renda média familiar (R\$)
A1	30 a 34	7.793
A2	25 a 29	4.648
B1	21 a 24	2.804
B2	17 a 20	1.669
C	11 a 16	927
D	6 a 10	424
E	0 a 5	207

Fonte: ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2003. Dados com base no Levantamento Sócio Econômico – 2000 – IBOPE

#### 4.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para determinar os grupos experimentais, foram considerados a “trombolização” utilizando alteplase e o comprometimento cognitivo na fase aguda. Foram utilizados 4 grupos experimentais com duas coletas sanguíneas durante a fase aguda e crônica da doença. A presença de comprometimento cognitivo e/ou demência é determinada pelos pontos de corte ajustados pela escolaridade no MEEM e pontuação maior ou igual a 0,5 na CDR (CHAVES et al., 2007). Para ter alteração pela escala do MEEM o escore deve ser igual ou abaixo do ponto de corte.

Escala CDR:

- CDR = 0,5 (comprometimento cognitivo ou demência questionável)
- CDR = 1 (demência leve)
- CDR = 2 (demência moderada)
- CDR = 3 (demência grave)

O pontos de corte utilizados para o MEEM foram:

- Analfabetos  $\leq 21$  (S = 93%, E = 82%)
- Baixa Escolaridade 1 a 5 anos completos  $\leq 24$  (S = 92%, E = 62%)
- Média Escolaridade 6 a 11 anos completos  $\leq 26$  (S = 93%, E = 67%)
- Alta Escolaridade 12 ou mais anos completos  $\leq 27$  (S = 96%, E = 62%)

Após a verificação de comprometimento cognitivo com o auxílio da combinação das escalas CDR e MEEM os grupos foram denominados da seguinte forma:

- Não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (“sem demência”, NT e SD)
- Não trombolizados e com comprometimento cognitivo (“com demência”, NT e D)
- Trombolizados e sem comprometimento cognitivo (“sem demência”, T e SD)
- Trombolizados e com comprometimento cognitivo (“com demência”, T e D)

#### 4.7 COLETA DE SANGUE

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue por meio de punção venosa periférica nos pacientes selecionados para o estudo. O procedimento de coleta de sangue aconteceu em dois momentos; na primeira avaliação do paciente e após 24 meses de acompanhamento permitindo controle dos níveis séricos de cada paciente. O sangue foi transferido para tubos EDTA que sofreram centrifugação para a posterior separação do plasma, por um período de 10 minutos, empregando-se a velocidade de 4000 rotações por minuto, a 4°C. O material sobrenadante foi armazenado em congelador a - 80°C.

##### 4.7.1 Isolamento de exossomos circulantes

O isolamento dos exossomos do plasma foi realizado utilizando um kit de ELISA específico (*miRCURY<sup>TM</sup> Exosome Isolation Kit, Exiqon*, Dinamarca) seguindo as instruções do fabricante. Primeiro, um volume de 0,6 mL de plasma foi centrifugado por 5 minutos a 10,000 x g para a remoção de detritos celulares. Após, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um vial onde foi adicionado 200  $\mu$ L de tampão de precipitação seguido de uma incubação de 60 minutos a 4 °C. Após a incubação, uma nova centrifugação de 30 minutos a 1,500 x g foi realizada em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet

ressuspendido em 270  $\mu\text{L}$  de tampão de ressuspensão usando um vórtex. Os exossomos isolados foram armazenados à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o dia dos experimentos.

#### **4.7.2 Níveis de espécies reativas em exossomos**

As espécies reativas foram quantificadas usando 2'-7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) com um “probe” (LEBEL et al., 1990). Em uma placa de 96 poços, a amostra contendo os exossomos foi incubada com DCFH-DA (100 mM) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e a formação de derivados oxidados fluorescentes (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação (488 nm) e emissão (525 nm). O procedimento foi realizado no escuro e brancos contendo DCFH-DA (sem exossomos) foram processados para a mensuração da autofluorescência (BERTOLDI et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2014). O conteúdo de espécies reativas foi mensurado usando uma curva padrão e normalizado pela proteína total.

#### **4.7.3 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos**

Para quantificar a atividade da SOD foi utilizado um kit comercial RANSOD (Randox Labs. San Diego, CA, USA). O kit utiliza o sistema xantina e xantina oxidase para a geração de radical superóxido, o qual reage com 2-(4-iodenafil) -3-(4-nitrofenol) -5-fenoltetrazolium formando o corante vermelho de formazan. A reação é realizada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a absorvância é mensurada a 505 nm. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD na amostra e os resultados (unidades de SOD) foram normalizados pela proteína total.

#### **4.7.4 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em exossomos**

A atividade da AChE (mg/proteína) foi avaliada através do método colorimétrico adaptado de Ellman e colegas (1961), usando acetilcolina iodada (Sigma, USA) como substrato. A taxa de hidrólise da acetilcolina iodada é mensurada a 412 nm através da liberação do composto tiol o qual produz coloração quando reage com DTNB (dos Santos et al., 2014). A atividade da AChE foi normalizada pela proteína total.

#### 4.7.5. Quantificação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais dos exossomos isolados do plasma foi quantificado através do método do azul de Coomassie usando albumina bovina como padrão (BRADFORD, 1976).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos dados numéricos. As variáveis categóricas foram expressas em média e desvio padrão quando não rejeitaram a hipótese de normalidade ( $p \geq 0,05$ ). As variáveis foram expressas em medianas e intervalos interquartis quando rejeitaram hipótese de normalidade ( $p \leq 0,05$ ).

Para comparação dos dados entre os grupos e as fases do AVE foi utilizado o método das equações de estimação generalizadas (EEG), seguido por comparações pareadas com correção sequencial de Bonferroni. Para verificar a existência de diferença significativa entre as médias cognitivas quanto à escolaridade, utilizou-se o Teste T Student para amostras independentes, e para checar a existência de relação entre as variáveis bioquímicas e o desempenho cognitivo dos pacientes aplicou-se a o teste de correlação de Spearman. Em todos os testes realizados o nível de significância aceito foi  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas nos programas estatísticos Statistical Package for the Social Science (SPSS), versão 18.0 e GraphPad Prism versão 7.0b.

#### 4.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Visando atender às Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos previstas pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde o projeto foi aprovado pela Comissão Coordenadora deste PPG (ANEXO E). Além disso, o parecer sobre a inclusão da análise adicional de exossomos pelo CEP/HCPA foi aprovado sob número 1.593.722.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) garantindo o anonimato das suas identidades e a liberdade em desistir em qualquer momento do estudo (ANEXO D).

Foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de boas práticas de laboratório, assim como, todas as medidas de proteção aos professores, pesquisadores e

bolsistas. Para manipulação das amostras sanguíneas, o uso de luvas de látex e de jalecos limpos foi obrigatório e a execução dos ensaios foi em grupo.

## 5 RESULTADOS

A amostra investigada foi caracterizada quanto aos aspectos pessoais (gênero, estado civil, idade, escolaridade e nível socioeconômico) e aspectos clínicos (hemisfério cerebral lesado, escalas NIHSS, CDR e MEEM) (Tabela 3). Os resultados encontrados apontaram para uma amostra de 22 pacientes, sendo que cada gênero foi representado por 11 indivíduos. O estado civil mais prevalente foi o casado (59,1%). A média de idade dos indivíduos foi de 66,4 anos ( $\pm 9,2$ ).

Com relação às características clínicas, o hemisfério cerebral direito foi o mais acometido (68,2%). Quanto ao estado neurológico, foi observado que a média da severidade clínica dos pacientes aferida pelo NIHSS foi de  $6,6 \pm 5,3$  na chegada à emergência hospitalar. Na fase aguda (30-90 dias do AVE) o escore do NIHSS apresentou mediana de 2 (0-4,25) e na fase crônica (2 anos da primeira avaliação) o escore foi de 2 (0-3).

Considerando que a escolaridade pode impactar o desempenho cognitivo, este critério foi analisado. Os níveis de escolaridade foram classificados da seguinte forma: analfabetos, baixa escolaridade (1 a 5 anos completos), média escolaridade (6 a 11 anos completos) e alta escolaridade (acima de 12 anos completos). Mais da metade da amostra apresentou nível médio de escolaridade (59%). Quanto ao desempenho cognitivo, constatou-se que a média do MEEM para os pacientes com baixa escolaridade foi de  $22,4 \pm 4,5$  e para aqueles com média escolaridade foi de  $24,8 \pm 3,4$  avaliados na fase aguda do evento isquêmico. Esses mesmo pacientes avaliados na fase crônica obtiveram média de  $22,1 \pm 3,5$  quando baixa escolaridade e  $22,4 \pm 5,7$  quando média escolaridade. Não houve diferença estatística entre os escores de avaliação cognitiva dos pacientes, avaliados pelo MEEM, quando comparados em relação à escolaridade.

Dos 22 pacientes selecionados, 9 foram elegíveis para o tratamento com trombolítico. Cabe lembrar que no intuito de avaliar o efeito da trombolização e o envolvimento no desempenho cognitivo, foram utilizados 4 grupos experimentais: Não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (“sem demência”, NT e SD); Não trombolizados e com comprometimento cognitivo (“com demência”, NT e D); Trombolizados e sem comprometimento cognitivo (“sem demência”, T e SD); Trombolizados e com comprometimento cognitivo (“com demência”, T e D). Ainda foram coletadas amostras nas fases aguda e crônica.

Para caracterizar o perfil dos exossomos, foi determinada a concentração total de proteínas. Outro marcador utilizado foi a atividade da enzima acetilcolinesterase.

Foi encontrada uma redução estatisticamente significativa na concentração de proteínas totais nos exossomos circulantes na fase crônica nos quatro grupos estudados: NT e SD ( $p<0,01$ ), NT e D ( $p=0,030$ ), T e SD ( $p<0,01$ ) e T e D ( $p<0,01$ ). Para avaliar os grupos ao longo do tempo, foi utilizado o modelo de cálculo de Equações de Estimações Generalizadas (EEG). Não houve diferença significativa entre os grupos, então esse resultado foi independente do tratamento com trombolítico ou da presença de demência na fase aguda do AVE (Figura 8).

Não houve qualquer diferença significativa na atividade colinesterásica exossomal (Figura 9). Contrariando nossa hipótese de trabalho, uma vez que sugerimos que a atividade AChE em exossomos poderia estar relacionada ao comprometimento cognitivo de pacientes pós AVEI.

Considerando que o estresse oxidativo tem papel central na fisiopatologia do AVE, quantificamos o conteúdo de espécies reativas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos circulantes desses pacientes. Na fase crônica, houve um aumento no conteúdo de DCF formado, utilizado como índice de conteúdo de espécies reativas nos grupos: NT e SD ( $p=0,013$ ), NT e D ( $p=0,043$ ), T e SD ( $p=0,022$ ) em relação à fase aguda. Surpreendentemente, no grupo T e D não houve diferença entre os tempos estudados (Figura 10). É importante destacar que não foi possível observar o envolvimento das espécies reativas exossomais no comprometimento cognitivo ou no tratamento trombolítico.

Encontramos um aumento significativo na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na fase crônica nos quatro grupos estudados: NT + SD ( $p<0,01$ ), NT + D ( $p=0,047$ ), T + SD ( $p<0,01$ ) e T + D ( $p=0,010$ ) quando comparados à fase aguda. O tratamento com trombolítico e a presença de demência na fase aguda também não impactaram este parâmetro bioquímico (Figura 11).

As associações entre as variáveis estudadas foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Não houve correlação significativa entre os escores cognitivo (MEEM) ou de gravidade neurológica (NIHSS) com os parâmetros bioquímicos avaliados quando foi tomado o número total de pacientes.

Encontramos uma correlação negativa muito forte entre os níveis de proteínas totais e SOD ( $\rho=-0,993$   $p<0,01$ ) na fase aguda (Figura 12). Além disso, houve uma forte correlação negativa entre a concentração de proteínas totais e os níveis de espécies reativas



nos exossomos circulantes na fase crônica ( $\rho=-0,725$   $p<0,01$ ; Figura 13). Ainda nesta fase, houve uma forte correlação positiva entre os níveis de espécies reativas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos exossomos circulantes ( $\rho=0,721$   $p<0,01$ ; Figura 14).

Também na fase crônica, foi verificada uma correlação positiva entre a quantificação de proteínas totais e a atividade da enzima AChE ( $\rho=0,674$   $p=0,001$ ), assim como uma correlação negativa entre AChE e SOD ( $\rho=-0,683$   $p<0,01$ ) (Figuras 15 e 16).

É interessante descrever que os pacientes que apresentaram pior desempenho cognitivo (com demência) apresentaram associações significativas entre os diferentes tempos testados. Houve uma correlação negativa entre os níveis de espécies reativas (fase aguda) e proteínas totais na fase crônica ( $\rho=-0,660$   $p=0,014$ ; Figura 17), além de uma forte correlação negativa entre os níveis de espécies reativas (fase aguda) e atividade de AChE na fase crônica ( $\rho=-0,742$   $p=0,004$ ; Figura 18), sugerindo que as espécies reativas nos exossomos na fase aguda podem estar envolvidas com as alterações observadas na fase crônica (proteínas totais, por exemplo).

Além disso, o conteúdo de espécies reativas na fase aguda se correlacionou positivamente com os níveis de SOD na fase crônica ( $\rho=0,665$   $p=0,013$ ), demonstrando que as espécies reativas podem alterar o perfil dos exossomos circulantes em longo prazo (Figura 19). É interessante ressaltar que esse impacto no perfil exossomal não foi identificado no grupo sem comprometimento cognitivo.

Observou-se uma correlação negativa entre a escala MEEM e os níveis de AChE ( $\rho=-0,655$   $p=0,015$ ; Figura 20) naqueles pacientes que não receberam o tratamento trombolítico na fase aguda. A correlação é perdida nos pacientes trombolisados.

Tabela 3 – Caracterização dos pacientes quanto aos aspectos pessoais e clínicos.

Variáveis	Pacientes (n=22)	p valor*
Idade, anos <sup>a</sup>	66,4 ± 9,2	
Gênero <sup>b</sup>		
Masculino	11 (50%)	
Estado civil <sup>b</sup>		
Casado	13 (59,1%)	
Viúvo	4 (18,2%)	
Solteiro	3 (13,6%)	
Divorciado	2 (9,1%)	
Escolaridade <sup>b</sup>		
Analfabetos	1 (4,6%)	
Baixa escolaridade	8 (36,4%)	
Média escolaridade	13 (59%)	
Nível socioeconômico <sup>b</sup>		
A2	2 (9,3%)	
B1	4 (18,3%)	
B2	9 (40,3%)	
C1	6 (27,5%)	
C2	1 (4,6%)	
Trombolítico <sup>b</sup>		
Sim	9 (41%)	
Não	13 (59%)	
Hemisfério lesado <sup>b</sup>		
Direito	15 (68,2%)	
Esquerdo	7 (31,8%)	
NIHSS (chegada) <sup>a</sup>	6,6 ± 5,3	
NIHSS (fase aguda) <sup>c</sup>	2 (0 - 4,25)	
NIHSS (fase crônica) <sup>c</sup>	2 (0 - 3)	
CDR <sup>b</sup>		
Piora	12 (54,5%)	
Igual	4 (18,2%)	
Melhora	6 (27,3%)	
MEEM (fase aguda) <sup>a</sup>		
Baixa escolaridade	22,4 ± 4,5	0,17 <sup>d</sup>
Média escolaridade	24,8 ± 3,4	
MEEM (fase crônica) <sup>a</sup>		
Baixa escolaridade	22,1 ± 3,5	0,90 <sup>d</sup>
Média escolaridade	22,4 ± 5,7	

<sup>a</sup>Variável categórica expressa em média e desvio padrão. <sup>b</sup>Variáveis categóricas expressas em porcentagem.

<sup>c</sup>Variável categórica expressa em mediana e intervalo interquartil. <sup>d</sup>Teste T Student para amostras independentes.

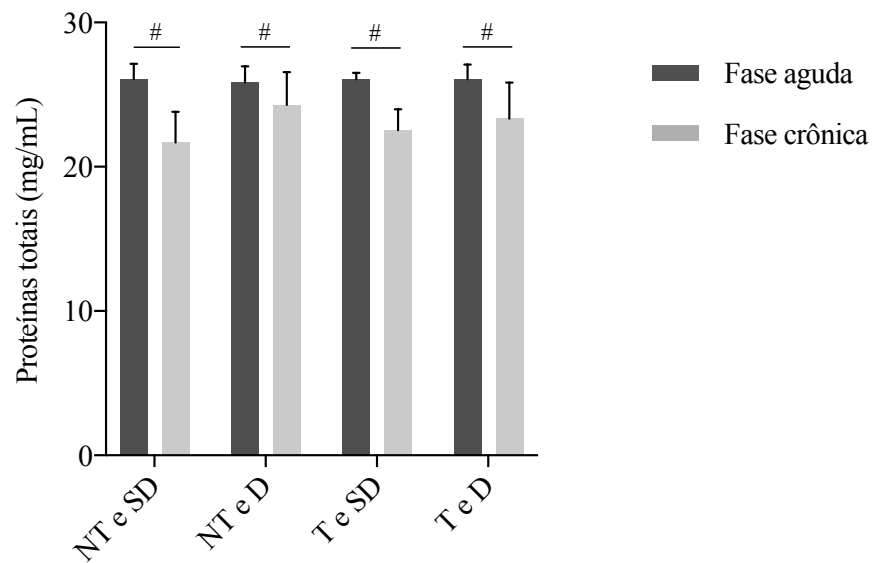


Figura 8 – Concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica. Grupos experimentais: não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (NT e SD; n=5); não trombolizados e com comprometimento cognitivo (NT e D; n=8); trombolizados e sem comprometimento cognitivo (T e SD; n=4) e trombolizados e com comprometimento cognitivo (T e D; n=5). As colunas representam média  $\pm$  desvio padrão; Equações de Estimações Generalizadas. #  $P \leq 0,05$ .

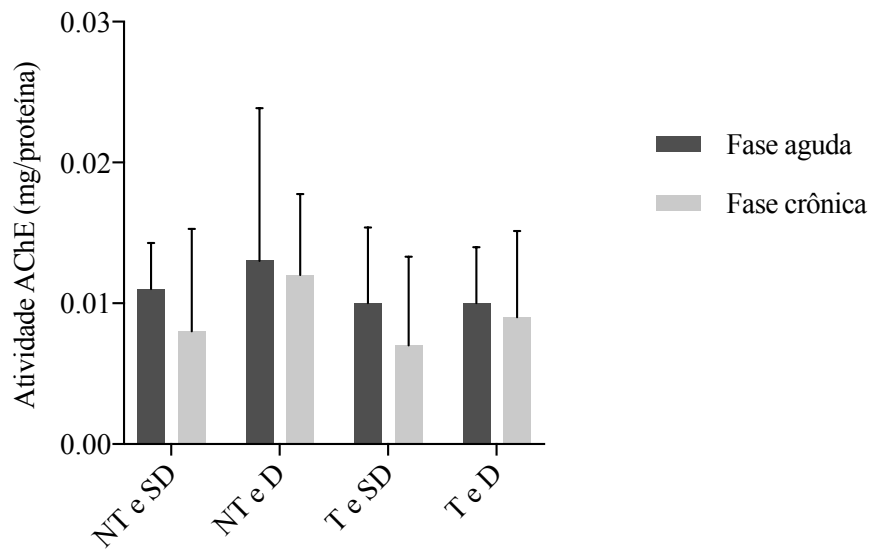


Figura 9 – Atividade da AChE em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica. Grupos experimentais: não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (NT e SD; n=5); não trombolizados e com comprometimento cognitivo (NT e D; n=8); trombolizados e sem comprometimento cognitivo (T e SD; n=4) e trombolizados e com comprometimento cognitivo (T e D; n=5). As colunas representam média  $\pm$  desvio padrão; Equações de Estimações Generalizadas.

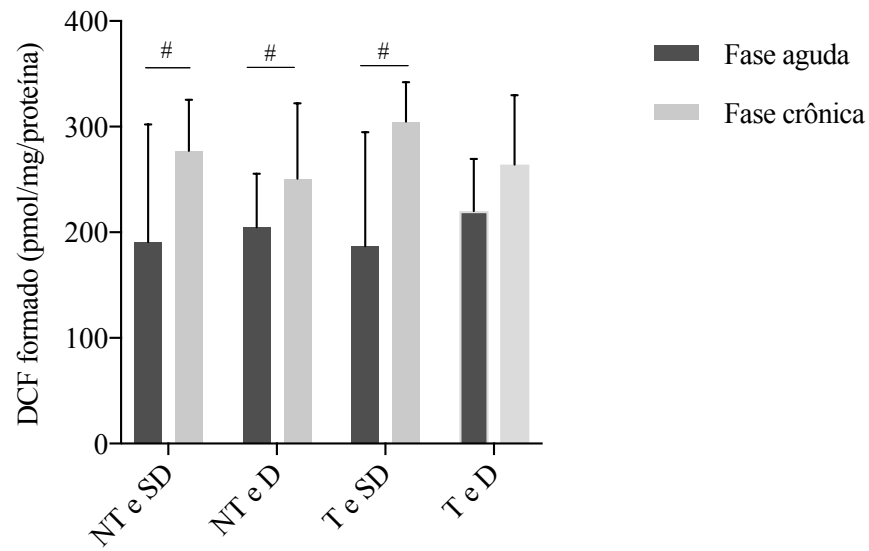


Figura 10 – Conteúdo de espécies reativas, avaliado pelo DCF formado em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica. Grupos experimentais: não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (NT e SD; n=5); não trombolizados e com comprometimento cognitivo (NT e D; n=8); trombolizados e sem comprometimento cognitivo (T e SD; n=4) e trombolizados e com comprometimento cognitivo (T e D; n=5). As colunas representam média  $\pm$  desvio padrão; Equações de Estimacões Generalizadas. #  $P \leq 0,05$ .

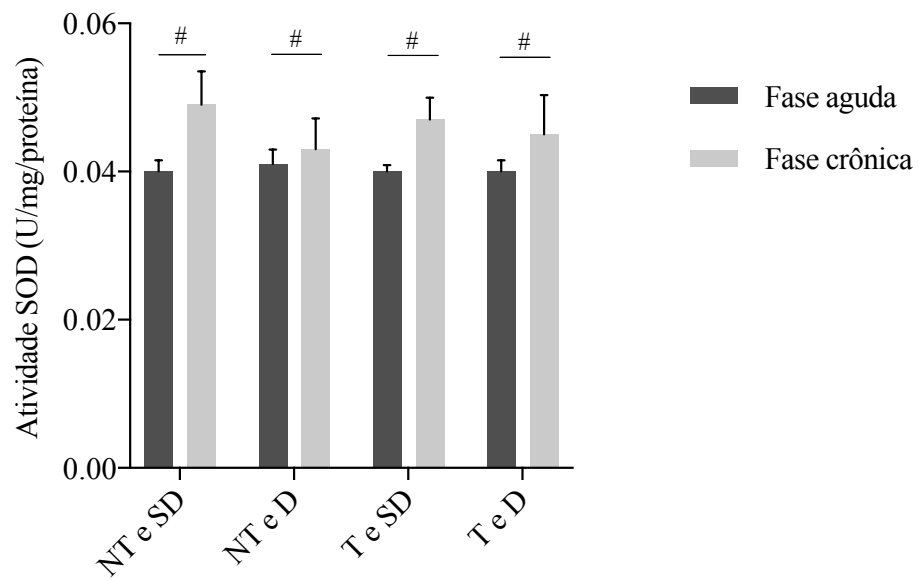


Figura 11 – Atividade da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica. Grupos experimentais: não trombolizados e sem comprometimento cognitivo (NT e SD; n=5); não trombolizados e com comprometimento cognitivo (NT e D; n=8); trombolizados e sem comprometimento cognitivo (T e SD; n=4) e trombolizados e com comprometimento cognitivo (T e D; n=5). As colunas representam média  $\pm$  desvio padrão; Equações de Estimações Generalizadas. #  $P \leq 0,05$ .

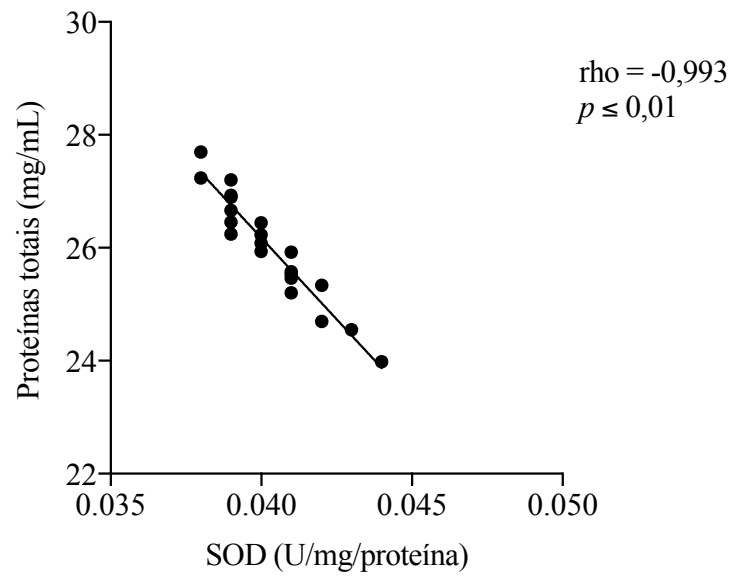


Figura 12 – Correlação entre a atividade da SOD e a concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase aguda. Todos os grupos testados; n=22. Teste de correlação de Spearman.

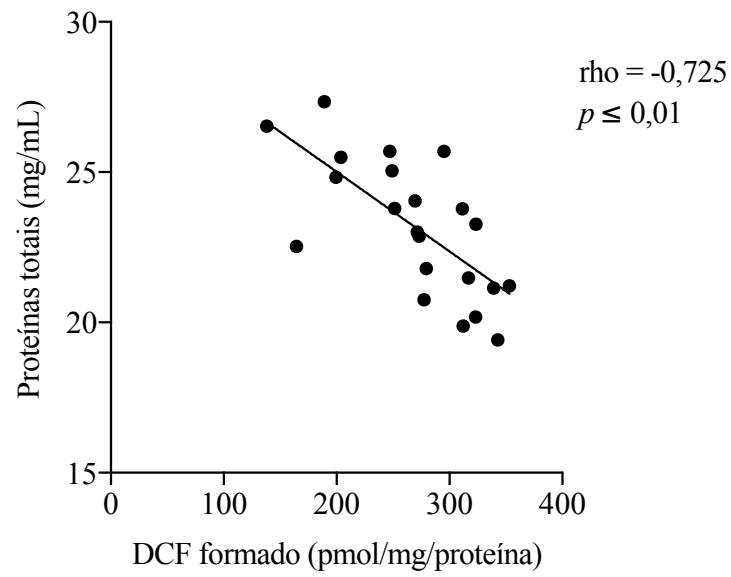


Figura 13 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) e a concentração de proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica. Todos os grupos experimentais; n=22. Teste de correlação de Spearman.



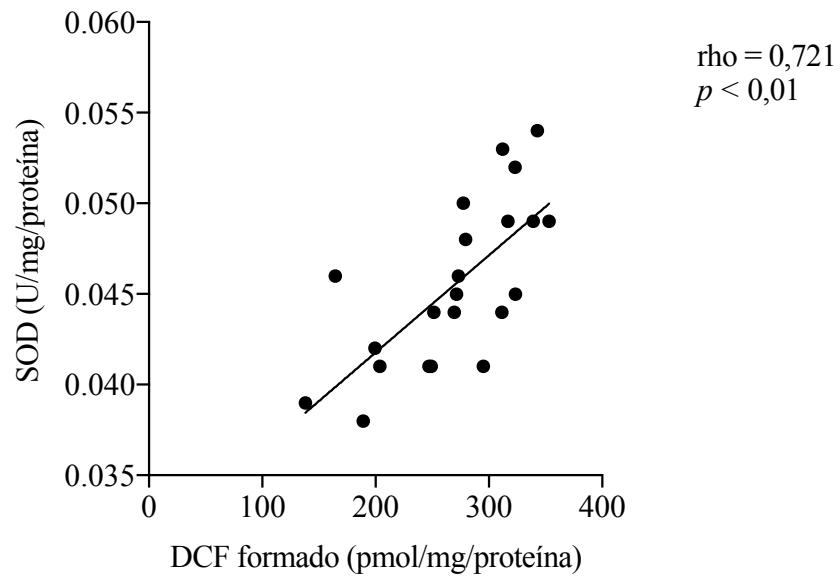


Figura 14 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) e a atividade da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica. Todos os grupos; n=22. Teste de correlação de Spearman.

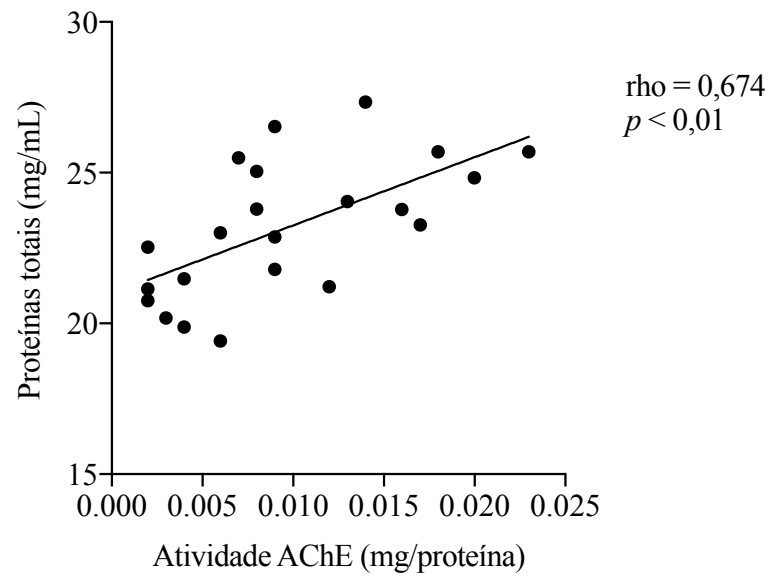


Figura 15 – Correlação entre a atividade da AChE e o conteúdo das proteínas totais em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica. Todos os pacientes foram avaliados; n=22. Teste de correlação de Spearman.

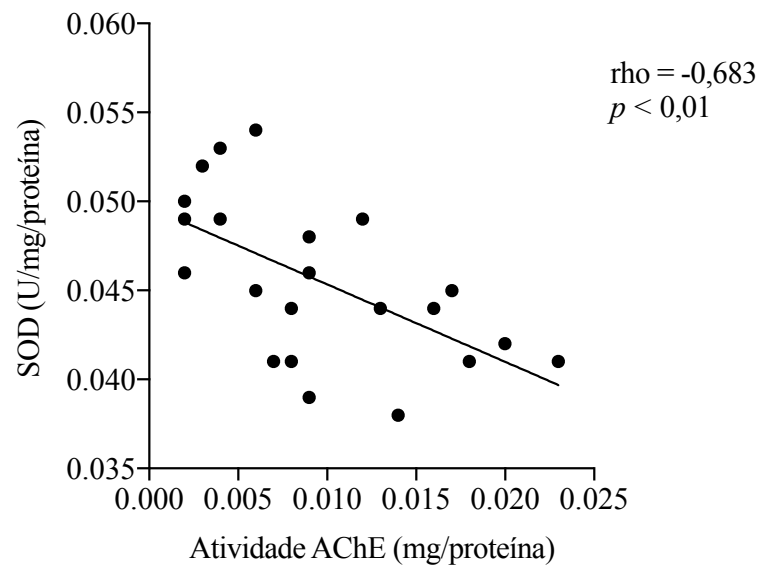


Figura 16 – Correlação entre as atividades da AChE e da SOD em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase crônica. Todos os grupos experimentais; n=22. Teste de correlação de Spearman.

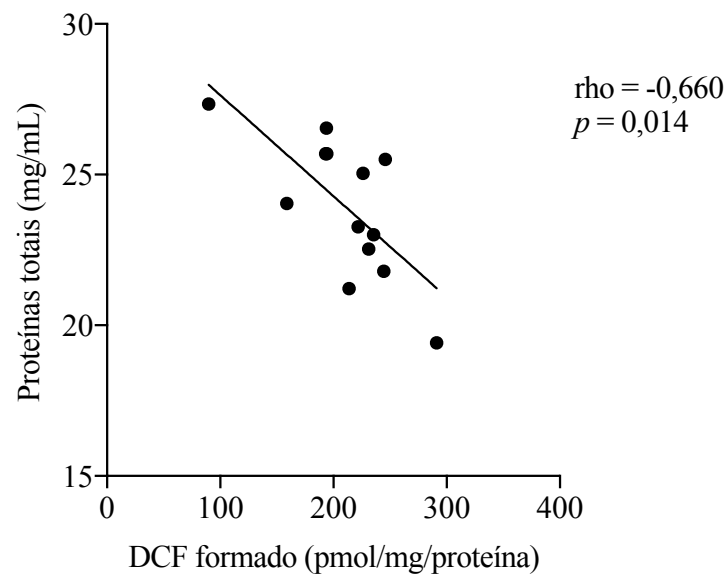


Figura 17 – Correlação entre níveis de espécies reativas (DCF formado) na fase aguda e o conteúdo das proteínas totais (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo (NT e D; T e D; n=13). Teste de correlação de Spearman.

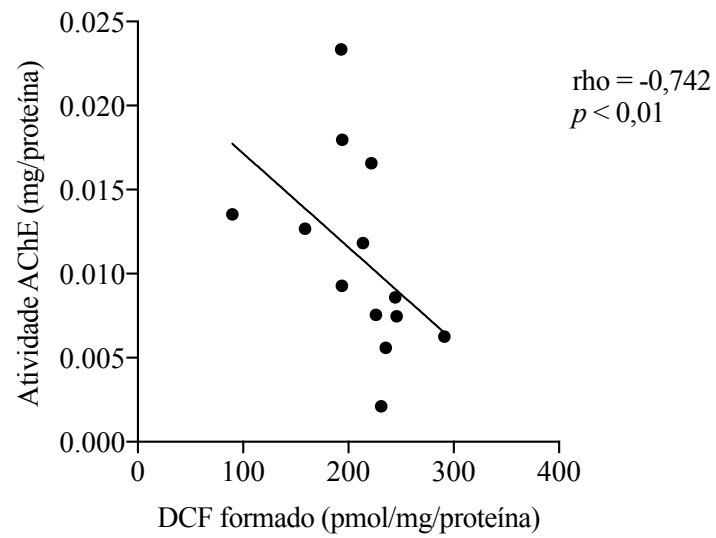


Figura 18 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) na fase aguda e a atividade da AChE (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo (NT e D; T e D; n=13). Teste de correlação de Spearman.

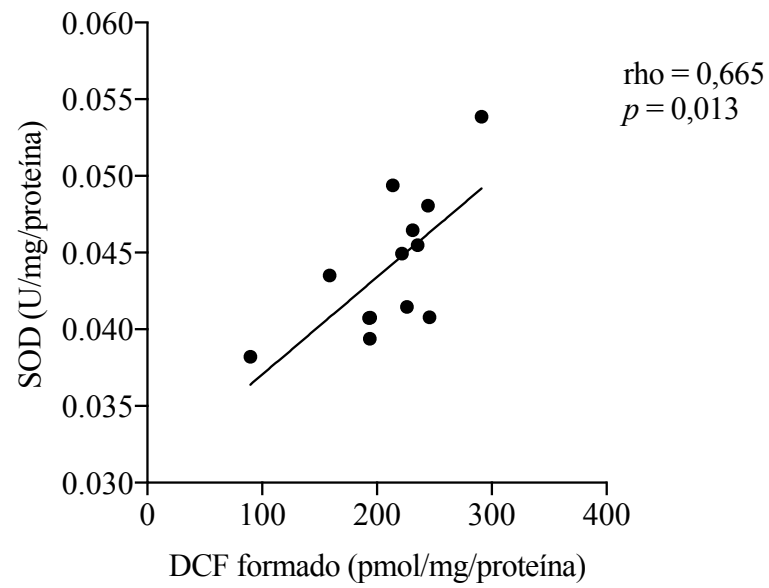


Figura 19 – Correlação entre os níveis de espécies reativas (DCF formado) fase aguda e a atividade da SOD (fase crônica) em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI com comprometimento cognitivo (NT e D; T e D; n=13). Teste de correlação de Spearman.

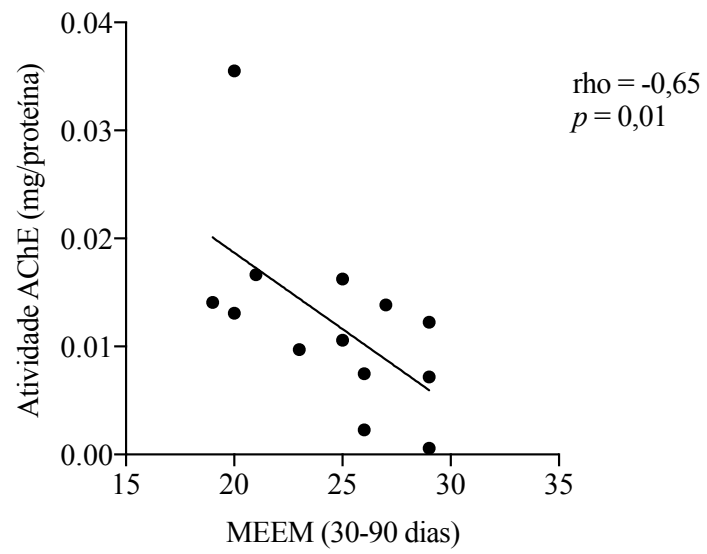


Figura 20 – Correlação entre escore MEEM com a atividade da AChE em exossomos circulantes de pacientes pós AVEI na fase aguda. Grupos avaliados: NT e D; NT e SD; n=13. Teste de correlação de Spearman.

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram encontrados resultados interessantes sobre o perfil de exossomos circulantes no acidente vascular encefálico isquêmico (AVEI). É importante ressaltar que, do nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro que monitora o perfil dos exossomos circulantes nas fases aguda e crônica do AVEI. Nossos dados sugerem que o perfil dos exossomos circulantes não está envolvido com o desempenho cognitivo após o AVEI, além disso, o tratamento com o trombolítico também não influenciou o perfil exossomal.

Neste trabalho podemos observar uma diminuição na concentração de proteínas totais de pacientes pós AVEI na fase crônica (dois anos da primeira avaliação) em todos os grupos estudados quando comparado a fase aguda (30 a 90 dias). Este resultado sugere uma redução de exossomos circulantes nesses pacientes ao longo do tempo.

Considerando que os exossomos estão associados à função de “limpeza” de materiais tóxicos, a redução de proteínas totais e a conseqüente modificação do perfil de exossomos ao longo do tempo no AVEI podem estar envolvidos no prejuízo do sistema de remoção desses materiais, levando ao seu acúmulo e conseqüente toxicidade (TERMAN & BRUNK, 2004; JOHNSTONE ET AL., 1991). Embora a atividade da enzima AChE também seja usada como marcador para estimar o nível de exossomos (PEREZ-GONZALEZ ET AL., 2012), dados do nosso laboratório indicam que esta enzima não é um bom instrumento para caracterizar os exossomos no envelhecimento (BERTOLDI, 2016).

Não foram encontradas quaisquer mudanças significativas na atividade da enzima AChE exossomal relacionadas ao comprometimento cognitivo ou ao tratamento trombolítico. Cabe descrever que este resultado contraria a nossa hipótese de trabalho, uma vez que sugerimos que a atividade AChE em exossomos poderia estar relacionada ao comprometimento cognitivo de pacientes pós AVEI.

Encontramos um aumento no conteúdo de espécies reativas, avaliado pela oxidação do “probe” DCF em exossomos circulantes na fase crônica do AVEI quando comparado à fase aguda. Keston e Brandt, em 1965, descreveram o uso do composto DCFH-DA em um ensaio fluorimétrico para análise de peróxido de hidrogênio. Então, em 1999, Wang e Joseph demonstraram que o DCFH-DA também pode ser oxidado por outros radicais livres, tais como o radical peróxido, peroxinitrito, óxido nítrico e dopamina, e sugeriu que o aumento da fluorescência de DCF reflete um índice de estresse oxidativo global nas células.



Já se sabe que espécies reativas contribuem para o desenvolvimento de processos que impedem a recuperação dos pacientes e exacerbam suas complicações vasculares (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005). Outros estudos também descreveram alterações no estado oxidativo em pacientes com AVEI, tais como o aumento dos níveis séricos de malondialdeído (MDA), conhecido produto da lipoperoxidação, durante a fase aguda (POLIDORI ET AL., 2002 & BOLOKADSE ET AL., 2004) e durante a fase crônica (CORRÊA ET AL., 2008) quando comparado com controles saudáveis, entretanto não houve diferença entre as fases aguda e crônica. Além disso, Alexandrova et al. (2004) demonstrou um aumento na formação de espécies reativas por fagócitos periféricos em pacientes com AVE. Consideramos esse resultado inovador, uma vez que não havia estudo, do nosso conhecimento, que avaliaram o conteúdo de espécies reativas exossomais no AVEI.

Até o momento, não é possível afirmar se as espécies reativas exossomais são formadas intrinsecamente. Alguns autores demonstraram uma produção intrínseca de espécies reativas geradas através das enzimas NADPH oxidase e NOS, em exossomos derivados de plaquetas de pacientes diagnosticados com choque séptico (AZEVEDO et al., 2007; GAMBIM et al., 2007; JANISZEWSKI et al., 2004).

Ainda, considerando que os exossomos possuem a capacidade de percorrer longas distâncias, altos níveis de espécies reativas em exossomos circulantes poderiam refletir os níveis teciduais destas espécies. Devido a habilidade dos exossomos em atravessar a BHE do SNC para o sangue e vice-versa (KANNINEN et al., 2015; LAKHAL & WOOD, 2011; SKOG et al., 2008), é possível sugerir que altos níveis de espécies reativas observadas em exossomos circulantes de pacientes após AVE contribuam para o aumento do estresse oxidativo periférico. Surpreendentemente, no grupo trombolisados e com comprometimento cognitivo não houve diferença entre os tempos estudados. Contrariando estudos que verificaram que pacientes com demência vascular apresentaram altos níveis de malondialdeído, um marcador de lipoperoxidação, e esses níveis foram maiores do que os relatados em pacientes com Alzheimer (GUSTAW-ROTHENBERG; KOWALCZUK; STRYJECKA-ZIMMER, 2010), sugerindo maiores danos oxidativos em pacientes com comprometimento cognitivo de origem vascular. Podemos inferir que os exossomos não estão envolvidos nestes achados descritos em pacientes com demência vascular. Ainda podemos comentar que uma das limitações, ainda que embora o isolamento dos exossomos tenha sido realizado utilizando um método significativamente reproduzível baseado na precipitação de vesículas, é impossível excluir que outras partículas como os quilomícrons (75-1200 nm)

possam estar presentes na amostra (SODAR ET AL., 2016) e estar envolvidas nas modificações descritas neste trabalho.

O estresse oxidativo é originado através de um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a ação das moléculas antioxidantes. Os antioxidantes têm um importante papel que consiste em superar a formação de espécies pró-oxidantes durante a isquemia / reperfusão, promovendo proteção do organismo (ZIMMERMANN ET AL., 2004). Segundo Leinone et al., (2000), acredita-se que os agentes antioxidantes do plasma e dos eritrócitos possam desempenhar papel importante contra o dano neurológico ocasionado pelo estresse oxidativo associado ao AVEI. Na primeira linha de defesa antioxidante, encontra-se a enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion superóxido para peróxido de hidrogênio. As enzimas glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT) protegem as células de efeitos do peróxido de hidrogênio, uma vez que catalisa a reação que transforma o peróxido de hidrogênio em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (MARGAILL; PLOTKINE; LEROUET, 2005).

Um perfil bastante complexo e interessante surgiu com os resultados referentes a atividade do sistema antioxidante. Observamos um aumento na atividade da SOD em todos os grupos estudados na fase crônica do AVEI comparada com a fase aguda. Aqueles grupos que também apresentaram níveis aumentados de espécies reativas, também apresentaram alterações na atividade da SOD, uma vez que houve uma forte correlação positiva entre os níveis de espécies reativas e a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos exossomos circulantes (Figura 14). Esse aumento na atividade da SOD pode sugerir um aumento na formação do radical superóxido (BENZI; MORETTI, 1995). Além disso, mesmo que não tenha sido quantificado, neste trabalho, a atividade da CAT e GPX, podemos sugerir que o aumento nos níveis de SOD propõe a acumulação de peróxido de hidrogênio que, na presença de íons metálicos, leva à formação do radical hidroxila, uma vez que o peróxido de hidrogênio não é efetivamente transformado em água.

É interessante que uma correlação negativa muito forte entre os níveis de proteínas totais e SOD foi encontrada na fase aguda, indicando que o conteúdo de SOD em exossomos está inversamente associado ao marcador de exossomos, as proteínas totais.

Corroborando esta inferência, nossos resultados mostram uma forte correlação negativa entre a concentração de proteínas totais e os níveis de espécies reativas nos exossomos circulantes na fase crônica (Figura 13), sugerindo que os níveis de espécies reativas está inversamente associado ao marcador de exossomos, as proteínas totais.

O papel da SOD no AVEI ainda não foi totalmente esclarecido. Há um diferente perfil da

atividade de SOD em pacientes com AVE dependendo da amostra avaliada. Alguns estudos observaram um aumento na atividade da SOD no plasma (GRUENER ET AL., 1994) ou no líquido cefalorraquidiano (GRUENER ET AL., 1994 & STRAND; MARKLUND, 1992), enquanto outros estudos encontraram uma redução desses níveis no plasma (SPRANGER ET AL., 1997) e nos eritrócitos (DEMIRKAYA ET AL., 2001) de pacientes com AVE. Os autores sugerem que os dados controversos podem estar relacionados com os diferentes métodos de análise e / ou com as diferentes isoformas da enzima (CuZnSOD, MnSOD e EC-SOD) (AYGUL ET AL., 2006).

Poucos trabalhos relacionam a SOD com aspectos funcionais do paciente. Guo e colaboradores (2013) descreveram que a concentração e a atividade da SOD têm uma correlação significativa com o déficit neurológico e o tamanho da isquemia. No entanto, o comprometimento cognitivo aqui observados não está relacionado a modificações na atividade da SOD em exossomos periféricos.

Como descrito acima, o perfil dos exossomos circulantes, especificamente atividade da AChE e a quantificação de proteínas totais, não está envolvido com o desempenho cognitivo após o AVEI ou com o tratamento trombolítico. Contudo, outras abordagens são de interesse do nosso grupo, como a quantificação do peptídeo  $\beta$ -amilóide, visto que estudos observaram que o peptídeo A $\beta$ 1-40 encontrado no plasma de pacientes após AVEI pode estar envolvido com aspectos vasculares da doença, assim como, o peptídeo A $\beta$ 1-42 pode estar envolvido com o processo neurodegenerativo (MOULIN et al., 2015). Além disso, para elucidar melhor o papel do trombolítico no conteúdo dos exossomos circulantes também é do nosso interesse quantificar exossomos de origem plaquetária, uma vez que já foi descrito que em desordens isquêmicas cerebrovasculares os exossomos desempenham um papel importante na ativação plaquetária nos indivíduos acometidos (LEE et al., 1993).

Ainda não houve qualquer diferença significativa na atividade colinesterásica exossomal quando realizada comparação entre as fases aguda e crônica. Entretanto, quando realizada correlação entre parâmetros bioquímicos com as escalas de déficit neurológico, encontramos correlação negativa entre a escala MEEM e os níveis de AChE naqueles pacientes que não receberam o tratamento trombolítico na fase aguda (Figura 20). Assim, nossos dados demonstram que o prejuízo cognitivo (menores escores de MEEM) está associados a maiores níveis de atividade da AChE em exossomos circulantes. É possível inferir que se trata de exossomos neurais carregando a AChE e outros componentes do sistema colinérgico do SNC para o sangue periférico, refletindo o desempenho cognitivo. Ainda, cabe

descrever que os inibidores da AChE promovem uma recuperação funcional em pacientes que sofreram AVE com comprometimento cognitivo (WHYTE et al., 2008), considerando que os pacientes com menor atividade da AChE em exossomos apresentaram melhor desempenho cognitivo, pode-se sugerir que os exossomos estão envolvidos na resposta aos inibidores da AChE nestes pacientes.

Outra abordagem utilizada neste trabalho foi correlacionar as diferentes variáveis nas duas fases estudadas, a fim de detectar preditores na primeira fase relacionados aos achados na fase crônica. É interessante descrever que os pacientes que apresentaram pior desempenho cognitivo (com demência) apresentaram associações significativas entre os diferentes tempos testados (Figuras 17-19). Houve uma correlação negativa entre os níveis de espécies reativas (fase aguda) e proteínas totais na fase crônica, além de uma forte correlação negativa entre os níveis de espécies reativas (fase aguda) e atividade de AChE na fase crônica, sugerindo que as espécies reativas nos exossomos na fase aguda podem estar envolvidas com as alterações observadas na fase crônica (proteínas totais, por exemplo). Além disso, o conteúdo de espécies reativas na fase aguda correlacionou positivamente com os níveis de SOD na fase crônica, demonstrando o forte papel das espécies reativas nas modificações em longo prazo dos exossomos circulantes de pacientes após AVEI com disfunção cognitiva. Além disso, sugerimos que os níveis de espécies reativas na fase inicial do evento isquêmico podem estar prejudicando o sistema colinérgico a longo prazo, uma vez que houve associação entre a atividade da AChE na fase crônica e os níveis de espécies reativas na fase aguda. Nossos dados sugerem que os níveis de espécies reativas podem predizer alterações no perfil dos exossomos na fase crônica.

Nossos dados permitem concluir que:

1. Na fase crônica, ocorre uma diminuição de exossomos circulantes, já que houve uma redução na quantificação de proteínas totais, o que pode sugerir um prejuízo no sistema de remoção de materiais tóxicos.
2. Na fase crônica, observamos estresse oxidativo em exossomos circulantes, representado pelos níveis de espécies reativas e a atividade da SOD
3. Os níveis de espécies reativas na fase aguda podem predizer alterações no perfil exossomal na fase crônica de pacientes com comprometimento cognitivo, especificamente nas atividades das enzimas SOD e AChE e na concentração de

proteínas totais.

4. O prejuízo cognitivo (menores escores de MEEM) está associado a maiores níveis de atividade da AChE em exossomos circulantes.

Perspectivas: Outras avaliações bioquímicas, como a determinação da tau fosforilada e do peptídeo B-amilóide, nos exossomos de pacientes pós AVEI nas fases aguda e crônica serão realizadas, a fim de melhor caracterizar o papel dos exossomos, tanto na fisiopatologia da isquemia cerebral, quanto na predição de diagnóstico de comprometimento cognitivo e resposta ao tratamento trombolítico.

## REFERÊNCIAS

- ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2003. Dados com base no Levantamento Sócio Econômico – 2000 – IBOPE.
- ADMYRE, S. M. et al. Exosomes with immunomodulatory features are present in human breast milk. **J. Immunol.**, v. 179, p. 1969–1978, 2007.
- ALLEN C.L., BAYRAKTUTAN U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**; 4: 461-470, 2009.
- ALEXANDROVA M. L., BOCHEV P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, p. 297–316, 2005.
- ALEXANDROVA, M. et al. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11(5), p. 501-506, 2004.
- ANDINE, P.; JACOBSON, I.; HAGBERG, H. Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postischemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 8: p. 799-807, 1988.
- ANDRE, C. Vascular dementia: a critical review of diagnosis and treatment. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3A, p. 498–510, 1998.
- AYGUL, R. et al. Plasma oxidants and antioxidants in acute ischaemic stroke. **Journal of international medical research**, v. 34(4), p. 413-418, 2006.
- AZEVEDO L. C. et al.. Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. **Crit Care Med**, 11(6), R120, 2007.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BELLINGHAM SA et al. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases. **Front Physiol**, v. 3(124), p. 1-10, 2012.
- BENZI, G. AND MORETTI, A. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 19, p. 77-101, 1995.
- BERTOLDI, K. Efeito do envelhecimento sobre a atividade de secretases e o perfil de exossomos circulantes: modulação pelo exercício físico. 2016 128 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

BERTOLDI, K. et al. Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and liver from rodents: modulation by photoelectrooxidation process. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 319-324, 2012.

BONITA R. Epidemiology of stroke. **Lancet**, v. 339, p. 342–344, 1992.

BRADFORD M. M. et al. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72(1-2), p. 248-254, 1976.

BRASIL/Ministério da Saúde/SE/Datasus (endereço na internet). Local: Sistema de Informações Hospitalares do SUS – SIH/SUS IBGE: base demográfica. (atualizado em: 12/2010).

CATHFLO® ACTIVASE® (ALTEPLASE). Cathflo’s proposed mechanism of action. San Francisco, 2016. Disponível em: <<https://www.cathflo.com/moa/>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

CAO, W. et al. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. **Neuroscience Letters**, v. 88, p. 233-238, 1988.

CHAVES, M. L. F. Testes de avaliação cognitiva: Mini-Exame do Estado Mental. Professora Adjunta da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Vice-coordenadora do DC de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da ABN – **Biênio 2006-2008**, p. 30, 2008.

CHAVES, M. L. F. et al. Validity of the clinical dementia rating scale for the detection and staging of dementia in Brazilian patients. **Alzheimer disease and associated disorders**, v. 21, n. 3, p. 210–217, 2007.

CHEN, HAI et al. “Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection.” **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14.8, p. 1505–1517, 2011.

CHUI, H. Dementia Attributable To Subcortical Ischemic Vascular Disease. **The Neurologist**, v. 7, p. 208–219, 2001.

CINCURA, C. et al. Validation of the National Institutes of Health Stroke Scale, modified Rankin Scale and Barthel Index in Brazil: The role of cultural adaptation and structured interviewing. **Cerebrovascular Diseases**, v. 27, n. 2, p. 119–122, 2009.

CLARK, W. M. et al. Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke. **Jama**, v. 282, n. 21, p. 2019–26, 1999.

DASURI, K., ZHANG, L., & KELLER, J. N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 170-185, 2013.

DE CARVALHO CORRÊA, M. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine**

and **Pharmacotherapy**, v. 62, n. 5, p. 317–324, 2008.

DE CARVALHO CORRÊA, M. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62(5), p. 317-324, 2008.

DICK, J. P. R.; GUILOFF, R. J.; STEWART, A. Mini-mental state examination in neurological patients. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 496–499, 1984.

DUGAN, L.; CHOI, D. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. **Basic Neurochemistry: Molec. Cell and Med. Aspects**, 6<sup>th</sup> edition, Chapter 34, 1999.  
DURON E, HANON O. Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. **Vasc Health Risk Manag**, v.4(2), p. 363-381, 2008.

DURON, E.; HANON, O. Vascular risk factors, cognitive decline, and dementia. **Vascular health and risk management**, v. 4, n. 2, p. 363–381, 2008.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7(2), p. 88-95, 1961.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIANDACA, M. S. et al. "Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: a case-control study." **Alzheimer's & Dementia**, v. 11.6, p. 600-607, 2015.

FOLSTEIN M. F., FOLSTEIN S. E., MCHUGH P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **J Psychiatr Res**, v. 12, p. 189-198, 1975.

FOLSTEIN M. Mini-mental and son. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 13, p. 290-294, 1998.

FRÖHLICH D. et al. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 369, p. 1-13, 2014.

FRUHBEIS, C. et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte–neuron communication. **PLoS Biol.**, v. 11, e1001604, 2013.

FUNAHASHI, T.; FLOYD, R.A.; CARNEY, J.M. Age effect on brain pH during ischemia/ reperfusion and pH influence on peroxidation. **Neurobiol. Aging**, v. 15, p. 161-167, 1994.

GLOBUS, M.Y-T. et al. Comparative effect of transient global ischaemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and Y-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, p. 470-478, 1991.



- GOLDBERG, W. J. et al. "The effects of ischemia and CDPamines on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat brain." **Neurochemical pathology**, v. 3.4, p. 237-248, 1984.
- GOLDSTEIN, L.B.; SAMSA, G.P. Reliability of the National Institute of Health Stroke Scale. **Stroke**, v. 28, p. 307-310, 1997.
- GONZALES, T. et al. Large-scale proteomics and phospho proteomics of urinary exosomes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, p. 363–379, 2009.
- GOTTFRIES, C. G. et al. "The neurochemistry of vascular dementia." **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 5.3-4, p. 163-167, 1994.
- GRAPP, A. et al. Choroid plexus transcytosis and exosomes shuttling deliver folate into brain parenchyma. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2123, 2009.
- GROSS J. S. et al. Autopsy study of the elderly institutionalized patient. Review of 234 autopsies. **Arch.Intern.Med.**, v. 148 (1), p. 173-176, 1988.
- GUO, Y. et al. (2013). Pathophysiology and Biomarkers in Acute Ischemic Stroke—A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12(6), p. 1097-1105.
- GUPTA A. & PULLIAM L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. **J Neuroinflammation**, v. 11(1), p. 68, 2014.
- GUTZEIT, C. et al. Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. **J. Immunol.**, v. 192, p. 5852–5862, 2014.
- HACKE, W. et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). **JAMA**, v. 274, p. 1017–1025, 1995.
- HACKE, W. et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *The Lancet*, v. 352(9136), p. 1245-1251, 1998.
- HAIDER, S. et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. **Age**, v. 36(3), p. 1291-1302, 2014.
- HAIRE W. D., HERBST S. F. Consensus conference on the use of alteplase (t-PA) for the management of thrombotic catheter dysfunction. **J Vasc Access Devices**, Summer 2000, p. 1-8.
- HEART AND STROKE FOUNDATION OF CANADA. Types of stroke. Canada, 2016. Disponível em: <http://www.heartandstroke.ca/stroke/what-is-stroke>. Acesso em: 20 fev. 2016.
- HUGHES C.P., BERG L., DANZIGER WL., et al. A new clinical scale for the staging of dementia. **Br J Psychiatr** v. 140, p. 566-572, 1982.

HUGHES M. et al. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. **Blood**, v. 96, n. 1, p 188-194, 2000.

HUGHES, C. P. et al. A New Clinical Scale for the Staging of Dementia. 1982.

JANISZEWSKI M. et al. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: a novel vascular redox pathway. **Crit. Care Med.**, v. 32, p. 818-825, 2004.

JIMENEZ J. J. et al. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. **Br J Haematol**, v. 112, n. 1, p. 81-90, 2001.

JOSHI P. et al. Microglia convert aggregated amyloid- $\beta$  into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. **Cell Death Differ.**, v. 21, p. 582–593, 2014.

JUNG K.W. et al. Coexisting carotid atherosclerosis in patients with intracranial small- or large-vessel disease. **J Clin Neurol**. 2012;8:104–108

KAHLES T.; BRANDES R.P. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. **Cell. Mol. Life Sci**. 2012, 69, 2345–2363.

KANNINEN K.M. et al. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1862(3), p. 403-410, 2015.

KASE, C. S. et al. Intellectual Decline After Stroke : The Framingham Study. **Stroke**, v. 29, n. 4, p. 805–812, 1998.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

KURIYAMA N., et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction. **Clin Appl Thromb Hemost**. 2010;16:26–32.

LEE Y. J. et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. **Thrombosis research**, v. 72(4), p. 295-304, 1993.

LINDAL E., STEFANSSON J.G. Mini-Mental State Examination scores: gender and lifetime psychiatric disorders, **Psychol Rep**, v. 72, p. 631-641, 1993.

LOOZE, D. et al. Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPAR gamma as an exosome-associated protein, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 378, p. 433–438, 2009.

LUKASIK M., et al. Enhanced platelet-derived microparticle formation is associated with carotid atherosclerosis in convalescent stroke patients. **Platelets**. 2013;24:63–70.

MAIA A. L. et al. Aplicação da versão brasileira da escala de avaliação clínica da demência (Clinical Dementia Rating CDR) em amostras de pacientes com demência. **Arq Neuro-Psiquiatr.**, v. 64, 2b, p. 8-489, 2006.

MAIA, A. L. G. et al. Aplicação da versão Brasileira da escala de avaliação clínica da demência (clinical dementia rating - CDR) em amostras de pacientes com demência. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 2 B, p. 485–489, 2006.

MARGAILL, I., PLOTKINE, M., & LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39(4), p. 429-443, 2005.

MASSOULIÉ, J. et al. "Molecular and cellular biology of cholinesterases." **Progress in neurobiology**, v. 41.1, p. 31-91, 1993.

MEHTA SL, MANHAS N, RAHUBIR R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Research Reviews**; 54: 34-66, 2007.

MELDRUM, B.S. Pathophysiology of cerebral ischaemia and trauma in relation to possible therapeutic approaches. In: MELDRUM, B.S.; WILLIAMS, M. (Eds.) **Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety, and Stroke Therapy**. New York: Wiley-Liss, p.275-290, 1990.

MICHAEL, S.D. et al. Exosomes from human saliva as a source of micro RNA biomarkers. **Oral Dis.**, v. 16, p. 34–38, 2010.

MIELKE O, WARDLAW J, LIU M. Thrombolysis (different doses, routes of administration and agents) for acute ischaemic stroke (Cochrane Review). In: **The Cochrane Library**, Issue 4, 2008.

MORI, E. et al. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. **Stroke**, v. 23, p. 712-8, 1992.

MORO, M.A. et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 1291-1304, 2005.

MORONEY, J. T. et al. Meta-analysis of the Hachinski Ischemic Score in pathologically verified dementias. **Neurology**, v. 49, n. 4, p. 1096–1105, 1997.

MORRIS J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, v. 43, p. 2412-2414, 1993.

MOULIN S. et al. A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 plasmatic levels in stroke: influence of pre-existing cognitive status and stroke characteristics. **Current Alzheimer research**, 2015.

MOYSÉS, F. et al. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 129, p. 160-166, 2014.

NIATSETSKAYA, Z.V. et al. Ten, V.S. The oxygen free radicals originating from mitochondrial complex I contribute to oxidative brain injury following hypoxia-ischemia in neonatal mice. **J. Neurosci.** 32, 3235–3244, 2012.

NIEUWLAND R. et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood**, v. 95, n. 3, p. 930-935, 2000.

NYUNT, M. S. Z. et al. Reliability and Validity of the Clinical Dementia Rating for Community-Living Elderly Subjects without an Informant. **Dementia and geriatric cognitive disorders extra**, v. 3, n. 1, p. 407–416, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) Project Investigators: The World Health Organization - MONICA Project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease). **J Clin Epidemiol.**, v.41, p.105-114, 1988.

ORGOGOZO JM. The concepts of impairment, disability and handicap. **Cerebrovasc Dis**, v. 4(Suppl 2):S2-S6, 1994.

PATEL, M. D.; COSHALL, C.; RUDD, A. G. Cognitive Impairment after Stroke : Clinical Determinants and Its Associations with Long-Term Stroke Outcomes. **JAGS**, v. 50, p. 700–706, 2002.

PEREZ-GONZALEZ R. et al. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. **J Biol Chem**, v. 287(51), p. 43108-43115, 2012.

POHJASVAARA T., ERKINJUNTTI T., VATAJA R., KASTE M. Correlates of dependent living 3 months after ischemic stroke. **Cerebrovasc Dis** v. 8, p. 259-266, 1998.

POHJASVAARA, T. et al. Correlates of dependent living 3 months after ischemic stroke. **Cerebrovascular Diseases**, v. 8, n. 5, p. 259–266, 1998.

RAJENDRAN L. et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 103, p. 172-177, 2006.

RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of cell biology**, v. 200(4), p. 373-83, 2013.

RAPOSO G., STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of cell biology**, v. 200(4), p. 373-383, 2013.

RENZ, S. V. Oxidação e Antioxidantes. In: SEMINÁRIO APRESENTADO NA DISCIPLINA BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL, NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DA UFRGS, 2003, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

ROMAN G. C. Cholinergic dysfunction in vascular dementia. **Curr Psychiatry Rep**, v. 7, p. 18–26, 2005.

ROMAN GC, KALARIA RN. Vascular determinants of cholinergic deficits in Alzheimer disease and vascular dementia. **Neurobiol. Aging**, v. 27, p. 1769–85, 2006.

ROMAN GC. Cholinergic dysfunction in vascular dementia. **Curr. Psychiatry Rep.**, v. 7, p. 18–26, 2005.

SACCO, S. E. et al. Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. **Stroke**, v. 22, n. 10, p. 1236–1241, 1991.

SAMAN S. et al. Exosome-associated Tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 3842–3849, 2012.

SAPOJNIKOVA N. et al. Plasma Antioxidant Activity as a Marker for a Favourable Outcome in Acute Ischemic Stroke, Antioxidant Enzyme, **InTech**, Chapter 6, 2012.

SCHETINGER, M. R. C. et al. "Pre-conditioning to global cerebral ischemia changes hippocampal acetylcholinesterase in the rat." **IUBMB Life**, v. 47.3, p. 473-478, 1999.

SCHLEGEL, D. et al. Utility of the NIH stroke scale as a predictor of hospital disposition. **Stroke**, v. 34, n. 1, p. 134–137, 2003.

SCREMIN, O. U.; JENDEN J.D. "Cholinergic control of cerebral blood flow in stroke, trauma and aging." **Life sciences**, v. 58.22, p. 2011-2018, 1996.

SHINKAWA A. et al. Silent cerebral infarction in a community-based autopsy series in Japan. The Hisayama Study. **Stroke**, v. 26 (3), p. 380-385, 1995.

SHIRLEY, R.; ORD, E.; WORK, L. Oxidative Stress and the Use of Antioxidants in Stroke. **Antioxidants**, v. 3, n. 3, p. 472–501, 2014.

SIESJO, B.K. Brain Energy Metabolism, John Wiley ed. New York, v. 5, n. 3, p. 1531-8249, 1978.

SILACHEV D. N. et al. Pathological changes after brain ischemia are similar to those observed in Alzheimer disease. **Patol. Fiziol. Eksp.**, v. 4, p. 53-58, 2014.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. "Acetylcholinesterase—new roles for an old actor." **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2.4, p. 294-302, 2001.

SPRANGER M. et al. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury correlation with clinical course and infarct size. **Stroke**, v. 28(12), p. 2425-2428, 1997.

STOKES, M. Physical Management in Neurological Rehabilitation. **Elsevier Mosby**, 2nd edition, 2004.

STREET, P.E. et al. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. **J. Transl. Med**, v.10, 2012.

TATEMICHII, T. K. et al. Clinical determinants of dementia related to stroke. **Annals of neurology**, v. 33, n. 6, p. 568–75, 1993.

THE NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE RT-PA STROKE STUDY GROUP. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **N Engl J Med.**, v. 333, p. 1581-1587, 1995.

TICKNER, J. A. et al. Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. **Front Oncol**, v. 4(127.10), p. 3389, 2014.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VACCARI, R. J. P. et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. **Journal of neurochemistry**, v.136 (S1), p. 39-48, 2015.

VALADI, K. et al. Exosome mediated transfer of mRNAs and micro RNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, **Nat. Cell Biol.** v.9, n. 6 , p. 654–659, 2007.

VAN BALKOM, B. W. M. et al. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. **Blood**, v. 121, p. 3997–4006 (S1-15), 2013.

VOJTECH, S. et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. 7290–7304, 2014.

WANG, S. et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 7275–7290, 2011.

WARDLAW J. M. et al. Imaging appearance of the symptomatic perforating artery in patients with lacunar infarction: occlusion or other vascular pathology? **Annals of neurology**, v. 50(2), p. 208-215, 2001.

WEINREB, O. et al. Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and  $\beta$ -amyloid in ageing and Alzheimer's disease. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 13, p. 2080-2094, 2015.

WHYTE, E. M. et al. An open-label pilot study of acetylcholinesterase inhibitors to promote functional recovery in elderly cognitively impaired stroke patients. **Cerebrovascular Diseases**, v. 26(3), p. 317-321, 2008.

XIN, Y. CHOPP, Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 33, p. 1711–1715, 2013.

YANG, S.J. Gould, The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 41, p. 277–282, 2013.

ZHANG, R.L. et al. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. **Neurology**, v. 44, p. 1747-1751, 1994.

ZHANG, Y. et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 11, p. 1233–1244, 2014.

ZIMMERMANN C. et al. Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk. **European Neurology**, v. 51, n. 3, p. 157-161, 2004.

YAMATO M.; EGASHIRA T.; UTSUMI H. Application of *in vivo* ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. **Free Radic. Biol. Med.**, 35, 1619–1631, 2003

## ANEXO A – NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH STROKE SCALE – NIHSS

Orientação	Definição Escala	Data	Data	Data
		Hora	Hora	Hora
<b>1a. Nível de consciência</b> - Escolher uma alternativa mesmo se avaliação prejudicada por tubo endotraqueal, linguagem ou trauma - Dar 3 somente se não for obtida resposta após estímulos dolorosos ou se o paciente apresentar apenas respostas reflexas.	0 = alerta 1 = desperta com estímulo verbal 2 = desperta somente com estímulo doloroso 3 = respostas reflexas ou sem resposta aos estímulos dolorosos			
<b>1b. Orientação: idade e mês</b> - Resposta deve ser correta, não há nota parcial. - Pacientes com afasia ou com alteração do nível de consciência, que não compreendem as perguntas, irão receber 2 - Intubação endotraqueal, trauma, disartria grave ou qq problema não secundário a afasia 1.	0 = ambas corretas 1 = uma questão correta 2 = ambas incorretas			
<b>1c. Comandos:</b> abrir e fechar olhos, apertar e soltar a mão - Realizar com a mão não-parética. - Substitua por outro comando se as mãos não puderem ser utilizadas. Crédito se a tentativa for realizada mas não realizada devido ao déficit neurológico. - Se não responder ao comando devem ser utilizados gestos.	0 = ambas corretas 1 = uma tarefa correta 2 = ambas incorretas			
<b>2. Motricidade ocular (voluntária ou olhos de boneca)</b> - Somente olhar horizontal testado. - Se o paciente tem paresia do III, IV ou VI isolada marque 1. Testar em pacientes afásicos. Pacientes com trauma ocular, ou alteração dos campos visuais devem ser testados com movimentos reflexos. - Todos pacientes são testados.	0 = normal 1 = paresia do olhar conjugado 2 = desvio conjugado do olhar.			
<b>3. Campos Visuais</b> - Se houver cegueira monocular os campos visuais do outro olho devem ser considerados. - Se o paciente for cego por qq outra causa marque 3 - Extinção, o paciente recebe 1 e os resultados são utilizados para responder a questão 11.	0 = normal 1 = hemianopsia parcial, quadrantopsia, extinção; 2 = hemianopsia completa 3 = cegueira cortical			
<b>4. Paresia Facial:</b> Considere simetria da contração facial em resposta aos estímulos dolorosos nos pacientes com alteração do nível de consciência.	0 = normal 1 = paresia mínima (aspecto normal em repouso, sorriso assimétrico) 2 = paresia/segmento inferior da face 3 = paresia/segmentos superior e inferior da face.			



<p><b>5. Motor membro superior braços estendidos 90° (sentado) ou 45° (deitado) por 10 s.</b></p> <p>- Iniciar com o lado não-parético.</p> <p>- Paciente afásico utilizar gestos e não utilizar estímulos dolorosos.</p>	<p>0 = sem queda 1 = queda, mas não atinge o leito; 2 = força contra gravidade mas não sustenta; 3 = sem força contra gravidade, mas qualquer movimento mínimo conta 4 = sem movimento.</p>	D	E	D	E	D	E
<p><b>6. Motor membro inferior</b> Elevar perna a 30° deitado por 5 s.</p>	<p>0 = sem queda 1 = queda, mas não atinge o leito; 2 = força contra gravidade mas não sustenta; 3 = sem força contra gravidade, mas qualquer movimento mínimo conta 4 = sem movimento.</p>	D	E	D	E	D	E
<p><b>7. Ataxia apendicular</b> - Faça os testes com os olhos abertos.</p> <p>Index-nariz e calcanhar Joelho em ambos os lados.</p> <p>- Ataxia considerada somente se for presente. - Se o paciente estiver afásico ou plégico não considerar.</p>	<p>0 = sem ataxia (ou afásico, hemiplégico) 1 = ataxia em membro superior ou inferior; 2 = ataxia em membro superior e inferior.</p>						
<p><b>8. Sensibilidade</b> - Afásico ou com rebaixamento do nível de consciência. 0 ou 1.</p> <p>- AVC de tronco com déficit bilateral =2.</p> <p>- Se o paciente não responder e estiver tetraplégico marque 2.</p> <p>- Pacientes em coma, recebem 2.</p>	<p>0 = normal 1 = déficit unilateral mas reconhece o estímulo (ou afásico, confuso) 2 = paciente não reconhece o estímulo ou coma ou déficit bilateral.</p>						
<p><b>9. Linguagem</b> - Descrever o que está acontecendo na figura, nomear os objetos e ler as frases da folha 2 e 3.</p> <p>- O paciente intubado deve ser solicitado para escrever uma frase. O paciente em coma recebe 3.</p> <p>- Mutismo que não consegue realizar nenhum comando=3</p>	<p>0 = normal 1 = afasia leve-moderada (compreensível) 2 = afasia severa (quase sem troca de informações) 3 = mudo, afasia global, coma.</p>						
<p><b>10. Disartria</b> Ler as palavras da folha 3.</p>	<p>0 = normal 1 = leve a moderada 2 = severa, ininteligível ou mudo X = intubado.</p>						
<p><b>11. Extinção/negligência</b> - Se houver grave déficit visual e os estímulos sensitivos normais, deve ser considerado normal.</p> <p>- Se paciente afásico, mas percebe ambos os lados, é considerado normal.</p> <p>- A negligência somente é considerada quando presente.</p>	<p>0 = normal 1 = negligência ou extinção em uma modalidade sensorial 2 = negligência em mais de uma modalidade sensorial.</p>						
<p style="text-align: center;"><b>Total</b></p>							

**ANEXO B – ESCALA CLINICAL DEMENTIA RATING – CDR**

<b>ESCORE</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>MEMÓRIA</b>	Nenhuma perda de memória, ou apenas esquecimento discreto e inconsistente	Esquecimento leve e consistente; lembrança parcial de eventos; esquecimento ‘benigno’	Moderada perda de memória, mais marcada para eventos recentes; déficit interfere com atividades diárias	Perda de memória grave; apenas material <i>muito</i> aprendido é retido; materiais novos são rapidamente perdidos	Perda de memória grave; apenas fragmentos permanecem
<b>ORIENTAÇÃO</b>	Plenamente orientado	Plenamente orientado	Alguma dificuldade nas relações temporais; orientado para lugar e pessoa no exame mas pode ter desorientação espacial	Geralmente desorientado	Orientação pessoal apenas
<b>JULGAMENTO E SOLUÇÃO DE PROBLEMAS</b>	Resolve bem problemas do dia-a-dia, bom julgamento em relação ao desempenho passado	Apenas comprometimento duvidoso na solução de problemas, similaridades e diferenças	Dificuldade moderada na solução de problemas complexos; julgamento social em geral mantido	Gravemente comprometido para solução de problemas, similaridades, e diferenças; julgamento social geralmente comprometido	Incapaz de realizar julgamentos ou solução de problemas
<b>ASSUNTOS NA COMUNIDADE</b>	Função independente no nível usual no trabalho, compras, negócios, finanças, e grupos sociais	Apenas comprometimento duvidoso nestas atividades	Incapaz de funcionar independentemente nestas atividades embora possa ainda engajar-se em algumas; pode ainda parecer normal à inspeção casual	Nenhuma pretensão de função independente fora de casa. Parece bem o suficiente para ser levado para atividades fora da casa da família	Nenhuma pretensão de função independente fora de casa. Parece muito doente para ser levado para atividades fora de casa
<b>LAR E HOBBIES</b>	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais bem mantidos	Vida em casa, hobbies, interesses intelectuais discretamente comprometidos	Comprometimento leve mas definido em casa: tarefas mais difíceis são abandonadas; hobbies mais complicados e interesses são abandonados	Apenas tarefas simples são preservadas; interesses muito restritos, pobremente sustentados	Nenhuma função significativa em casa ou fora do quarto
<b>CUIDADOS PESSOAIS</b>	Plenamente capaz	Plenamente capaz	Necessita assistência ocasional	Requer assistência para vestir-se, na higiene	Requer muito auxílio nos cuidados pessoais, em geral incontinente
<b>GLOBAL</b>	<b>Saudável (normal)</b>	<b>Demência questionável</b>	<b>Demência leve</b>	<b>Demência moderada</b>	<b>Demência grave</b>

Fontes:

Chaves ML, Camozzato A, Godinho C, et al. Validity of the Clinical Dementia Rating Scale for The Detection and Staging of Dementia in Brazilian Patients. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2007; 21:210-217.

Hughes CP, Berg L, Danziger WL, et al. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatr* 1982; 140: 566-72.

**ANEXO C – MINI EXAME DO ESTADO MENTAL – MEEM**

**ORIENTAÇÃO**

- \* Qual é o (ano) (estação) (dia semana) (dia mês) e (mês).
- \* Onde estamos (país) (estado) (cidade) (rua) (no).

 5

**Rua** é usado para visitas domiciliares, **local** para consultas no Hospital ou outra instituição!

**REGISTRO**

- \* Dizer três palavras: PENTE RUA AZUL. Pedir para prestar atenção pois terá que repetir mais tarde. Pergunte pelas três palavras após tê-las nomeado. Repetir até que repita corretamente e anotar número de vezes: \_\_\_\_

 3

 5

 3

 2

 1

 3

 1

 1

<sup>1</sup> **Alternativo** é usado quando o entrevistado erra **JÁ** na primeira tentativa, **OU** acerta na primeira e erra na segunda. **SEMPRE** que o alternativo for utilizado, o escore do item será aquele obtido com ele. **Não importa se a pessoa refere ou não saber fazer cálculos** – de qualquer forma se inicia o teste pedindo que faça a subtração inicial. A ordem de evocação tem que ser exatamente à da apresentação!

**ATENÇÃO E CÁLCULO**

- \* Subtrair: 100-7 (5 tentativas: 93 – 86 – 79 – 72 – 65)  
Alternativo: série de 7 dígitos (5 8 2 6 94 1)

**EVOCAÇÃO**

- \* Perguntar pelas 3 palavras anteriores

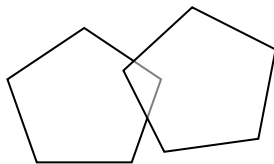
**LINGUAGEM**

- \* Identificar lápis e relógio de pulso
- \* Repetir: “Nem aqui, nem ali, nem lá”.
- \* Seguir o comando de três estágios: “Pegue o papel com a mão D, dobre ao meio e ponha no chão”.
- \* Ler ‘em voz baixa’ e executar:



**FECHE OS OLHOS**

- \* Escrever uma frase (um pensamento, idéia completa)
- \* Copiar o desenho:



TOTAL: \_\_\_\_\_

Fonte:

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. J Psychiatr Res 1975; 12:189-198.

## **ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA**

Nome do estudo: **RELAÇÃO ENTRE FATOR NATRIURÉTICO TIPO B, HOMOCISTEÍNA E TROMBOLÍTICOS COM O DESENVOLVIMENTO DE DEMÊNCIA PÓS ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.**

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Pesquisadora responsável: Márcia L. F. Chaves

Telefones para contato: Dra.Márcia L. F. Chaves: 33598520 /33598182

(Serviço de Neurologia - HCPA)

Sr.(A) \_\_\_\_\_,

gostaríamos de convidar-lhe a participar de um estudo, que tem por objetivo avaliar a relação entre uma substância do seu sangue que o Sr(a) possa ter em quantidade alterada que está relacionada com a memória e com o desempenho cognitivo após o derrame.

#### **1)EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS:**

O (A) senhor (a) será encaminhado para realizar uma entrevista que consta de alguns testes (perguntas) que irão avaliar sua memória, atenção, orientação e capacidade motora as quais não trarão qualquer prejuízo a sua condição de saúde atual. Também será coletada uma amostra de 10ml do seu sangue. Este sangue será armazenado em um freezer no centro de pesquisa experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para ser analisado no final do estudo. Sua participação é voluntária. O fato de o Sr(a) não querer participar, não prejudicará a assistência médica que recebe no HCPA. Esta avaliação será repetida a cada 6 meses durante o período de 18 meses totalizando 4 entrevistas ao longo do estudo. A duração total de cada avaliação (entrevista e coleta de sangue) será de aproximadamente 1 hora. Se em algum momento durante o período do estudo esses testes mostrarem algum prejuízo o (a) senhor (a) será encaminhado para o Ambulatório de Neurogeriatria desse hospital para receber acompanhamento adequado. Informamos também, que algumas informações do seu prontuário do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, serão utilizadas para o conhecimento do seu histórico de internação, informações estas que serão utilizadas apenas para a presente

pesquisa. Caso necessite de outros esclarecimentos poderei entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) pelos telefones 3359.83.04 ou 3359.82.90, das 8h às 17h.

2) **POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS:** Poderá haver desconforto e dor durante o procedimento da retirada da amostra de sangue podendo aparecer após o procedimento uma “pequena mancha roxa” no local da punção. O tempo de espera e o tempo gasto com a entrevista também podem ser desconfortáveis.

3) **BENEFÍCIOS E CUSTOS:** Identificar alterações de memória precocemente e encaminhar o Sr.(a) para adequado tratamento. A sua participação é totalmente voluntária não acarretando em nenhum ônus financeiro.

4) **DIREITO DE DESISTÊNCIA:** O (A) senhor (a) pode desistir de participar a qualquer momento, sem qualquer consequência para seu atendimento no Hospital de Clínicas.

5) **SIGILO:** Todas as informações obtidas neste estudo poderão ter publicação com finalidade científica, preservando-se o completo anonimato dos participantes.

6) **CONSENTIMENTO:** Declaro ter lido – ou me foi lido – as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte, voluntariamente, do presente estudo. A assinatura deste termo será em duas vias, permanecendo uma delas comigo e a outra via com os pesquisadores do projeto. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Caso necessite de outros esclarecimentos poderei entrar em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) pelo telefone 3359.76.40 no horário das 08h às 17h. O pesquisador responsável, o paciente e/ou um responsável deverão assinar o termo de consentimento. Por este instrumento tomo parte, voluntariamente, do presente estudo.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

---

Assinatura do participante

Nome do responsável do participante

## ANEXO E – PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 305 - Porto Alegre, RS  
Fone: +55 51 33083121, e-mail: ppgfarmaco@ufrgs.br  
[www.ufrgs.br/farmacologia](http://www.ufrgs.br/farmacologia)



### PARECER DE PROJETO DE PESQUISA DE MESTRADO

**Aluno(a) de Mestrado:** Amanda de Souza Magalhães

**Título do Projeto:** Exossomos como preditores prognóstico de demência e de eficácia do tratamento com trombolíticos no acidente vascular encefálico


**Orientador:** Profa. Ionara Rodrigues Siqueira

O projeto referido acima foi analisado pela Comissão de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

Com base na avaliação, a Comissão de Pós-Graduação considera que o projeto tem mérito, e se enquadra no perfil do Programa, estando aprovado quanto aos aspectos científicos e éticos.

**Recomendação final:** Aprovação

Porto Alegre, 02 de junho de 2016.

  
Prof. Dra. Patrícia Pereira  
Coordenadora

Programa de Pós - Graduação  
em Ciências Biológicas  
Farmacologia e Terapêutica  
ICBS/UFRGS